

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1971 - N° 588

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PROTÉINES
DU LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN
PAR ÉLECTROPHORÈSE
SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE**

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon
Section de PHARMACIE
présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Claude-Bernard - Lyon
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

le 22 Décembre 1971

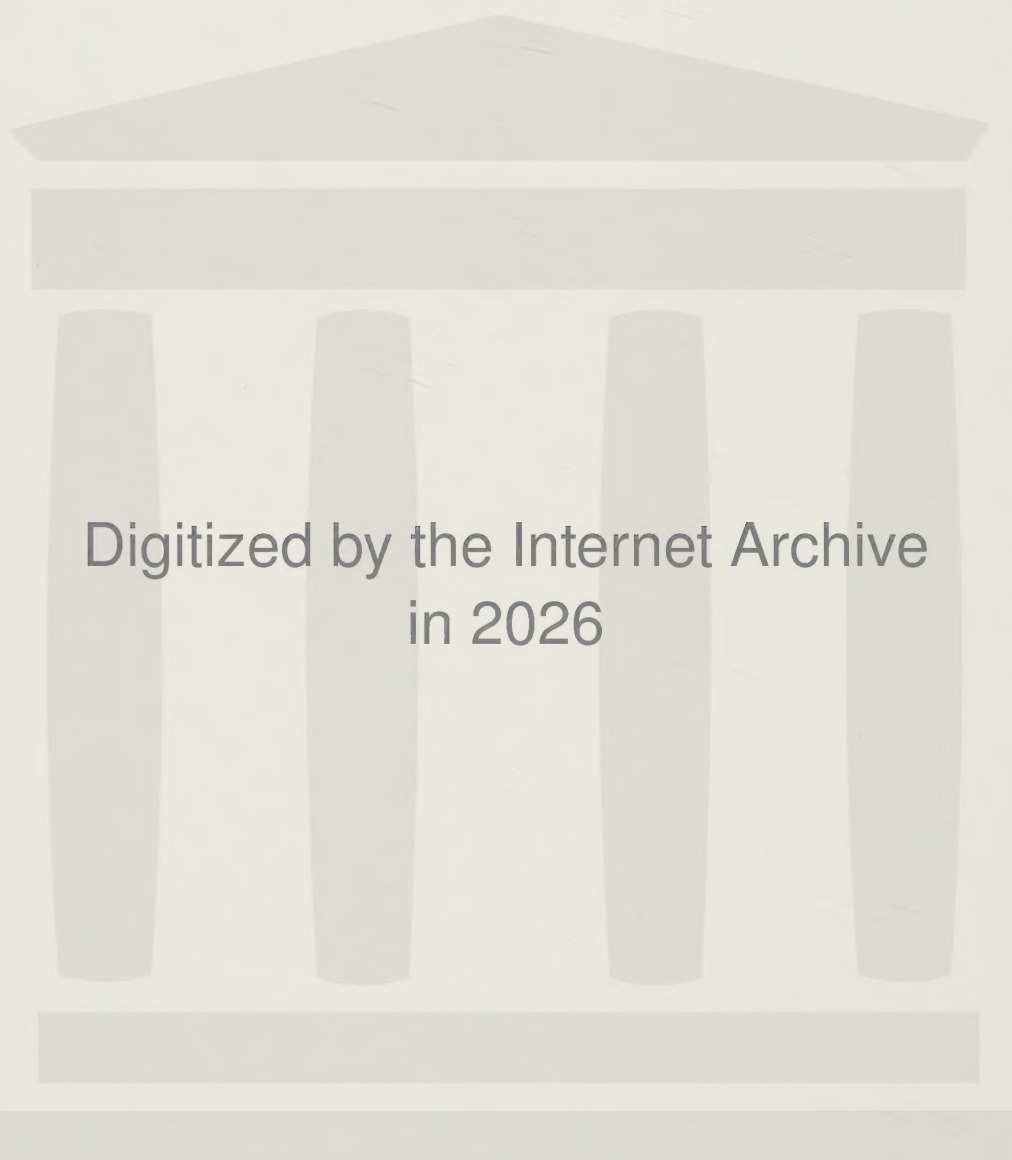
par

Jean-Bernard SENETERRE

né le 24 Juin 1944

à SAINT-ÉTIENNE

**Association Amicale des Etudiants en Pharmacie
de Lyon**



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552607_0015

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1971 - N° 588

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PROTÉINES
DU LIQUIDE CÉPHALO-RACHIDIEN
PAR ÉLECTROPHORÈSE
SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE**

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon
Section de PHARMACIE
présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Claude-Bernard - Lyon
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

le 22 Décembre 1971

par

Jean-Bernard SENETERRE

né le 24 Juin 1944

à SAINT-ÉTIENNE



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD
L Y O N

Président : Monsieur le Professeur J. BOIDIN

1er Vice-Président : M.R. TOURAINE, Maître de Conférence agrégé

2ème Vice-Président : M.P. PONCET, Maître-Assistant

3ème Vice-Président : M.D. SETTELEN, Etudiant

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

UNITES

DIRECTEURS

E.R. médicale Grange-Blanche
E.R. médicales Alexis-Carrel
E.R. médicale Lyon-Nord
E.R. médicale Lyon Sud Ouest
E.R. des Sciences Pharmaceutiques
E.R. des Techniques de Réadaptation
E.R. de Biologie Humaine
Institut Régional d'Education Physique
Sportive

E.R. de Mathématiques
E.R. de Physique
E.R. de Chimie et Biochimie
E.R. des Sciences de la Nature
E.R. de Biodynamique et Psychopédagogie
E.R. de Physique nucléaire
Institut Universitaire de Technologie I
Institut Universitaire de Technologie II
Observatoire

M. le Professeur D. GERMAIN
M. le Professeur C. GIROD
M. le Professeur A. BERTOYE
M. le Professeur L. TOLOT
M.M.CARRAZ Maître de Conférences-Agr.
M. le Professeur P. MOUNIER-KUHN
M. J.C. CZYBA Maître de Conf.-Agr.
M. J. SAPIN, Professeur E.P.S.

M. le Doyen J. BRACONNIER
M. le Professeur M. DUFAY
M. le Professeur D. GAUTHERON
M. le Professeur L. DAVID
M. le Professeur J. CHANEL
M. le Professeur A. SARAZIN
M. le Professeur L. FEUVRAIS
M. J. GALLET
M. le Professeur J.H. BIGAY

Secrétaire Général : M. P. IZAUTE

A ma Femme

A mes Parents

A mes Beaux-Parents

A mes Frères et Soeurs

A toute ma Famille

A mes Amis

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR A. BADINAND

Nous sommes très sensibles à l'honneur qu'il nous fait en acceptant la présidence de notre jury de thèse.

Ayant effectué toutes nos études pharmaceutiques à l'Université de CLERMONT-FERRAND, nous tenons à le remercier de sa bienveillance constante qui nous facilita notre intégration à l'équipe lyonnaise des internes en pharmacie.

Nous avons eu la chance durant un semestre dans son service au laboratoire central de Biochimie A de l'Hôpital Edouard-Herriot d'apprécier son talent d'organisateur.

Nous lui exprimons notre profonde gratitude et notre respectueuse admiration.

A NOS JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGREGE Cl. QUINCY

Nous lui devons l'idée de l'étude que nous avons réalisée. Son soutien fut constant dans notre labeur. Ses conseils si nombreux nous furent prodigués sans relâche.

Nous le félicitons d'avoir su créer une équipe autour de ce travail.

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. MALLEIN

Nos amis qui furent ses internes et ses assistants nous ont dit ses qualités humaines et sa compétence dans le domaine de la Biochimie à l'Hôpital comme à la Faculté.

MONSIEUR LE PROFESSEUR B. SCHOTT

Nous le remercions de sa gentillesse et de l'intérêt qu'il porte à notre travail.

Nous admirons profondément ses compétences médicales et son esprit ouvert à tous les problèmes.

Nous sommes heureux et fiers de le compter parmi nos juges.

A Monsieur le Docteur R. LATER, assistant
des Hôpitaux dans le service de Monsieur
le Professeur Agrégé Cl. QUINCY.

A Madame le Docteur F. TOURAINÉ, assistante
du Laboratoire de Biochimie de la Pharmacie
de l'Hôpital Neurologique.

A Tous les Internes en Pharmacie de
l'Hôpital Neurologique et Cardiologique.

A nos camarades Internes et Anciens Internes.

Nous tenons à remercier

Monsieur le Docteur MICHEL, Chef
de clinique dans le service du
Professeur P. GIRARD à l'Hôpital
Neurologique.

Monsieur Y. PEGON et Mademoiselle
D. GRIMAUD attachés dans le service
de Monsieur le Professeur Agrégé
Cl. QUINCY.

INTRODUCTION

=====

Dans le cadre des travaux biochimiques réalisés sur les protéines du L.C.R. nous nous sommes proposés une étude électrophorétique de ce liquide sur gel de polyacrylamide. Tout au long de notre travail, notre modeste contribution s'est constamment vue justifiée par trois motifs essentiels.

Premièrement l'utilisation de cette technique moderne au laboratoire de biochimie de la pharmacie de l'Hôpital Neurologique pour l'établissement des formules protéiques du L.C.R.

Deuxièmement les renseignements, peu nombreux à notre connaissance, fournis par la littérature sur l'identité des très nombreuses fractions séparées par cette méthode, expliquent pleinement notre tentative d'identification de certaines de ces fractions.

Troisièmement si les performances techniques de la méthode ont motivé fortement notre travail, jamais nous n'avons oublié l'intérêt diagnostic d'une telle étude dans le cadre souvent complexe des affections neurologiques.

Dans un premier temps nous avons essayé de faire le point sur la question, en passant en revue les principales méthodes d'étude des protéines du L.C.R., tout en sachant bien qu'il ne nous serait pas possible de tout dire à ce sujet, tant les méthodes ont été nombreuses jusqu'à ce jour, et certaines d'ailleurs n'ont plus actuellement qu'un intérêt historique.

Notre travail a porté d'une façon plus précise sur le problème de l'identification des nombreuses fractions séparées électrophorétiquement sur gel de polyacrylamide.

Dans ce but nous avons utilisé d'une part des sérums monospécifiques anti S.H.N. fourni par le commerce, d'autre part un sérum anti L.C.R. obtenu personnellement par immunisation d'un animal.

Dans une dernière partie, en nous référant d'une part aux données de la littérature, d'autre part à notre expérience personnelle, nous avons tenté un essai de classification des variations protéiques observées au cours de certaines affections neurologiques.

P L A N

=====

INTRODUCTION

CHAPITRE I

TRAVAUX ANTERIEURS

METHODE D'ETUDE DES PROTEINES DU L.C.R.

1. METHODES DE FLOCCULATION

1.1. Techniques qualitatives

1.2. Techniques quantitatives

1.3. Conclusions

2. METHODES ELECTROPHORETIQUES

2.1. Considérations générales

2.2. Méthodes d'enrichissement en protéines du L.C.R.

2.2.1. Techniques de déminéralisation

2.2.1.1. Procédés physiques

2.2.1.2. Procédés physico-chimiques

2.2.2. Techniques de concentration

2.3. Electrophorèse sur bande de papier.

2.3.1. Généralités

2.3.2. Techniques

2.3.3. Résultats

2.3.4. Discussion

2.4. Electrophorèse sur gel d'agar.

2.4.1. Généralités

2.4.2. Techniques

2.4.3. Résultats

2.4.4. Discussion

2.5. Electrophorèse sur bande d'acétate de cellulose.

2.5.1. Généralités

2.5.2. Techniques

2.5.3. Résultats

2.5.4. Discussion

2.6. Electrophorèse sur gel d'agarose

2.6.1. Généralités

2.6.2. Techniques

2.6.3. Résultats

2.6.4. Discussion

2.7. Electrophorèse sur gel d'amidon

2.7.1. Généralités

2.7.2. Techniques

2.7.3. Résultats

2.7.4. Discussion

2.8. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

2.8.1. Généralités

2.8.2. Techniques

2.8.3. Résultats

2.8.4. Discussion

2.9. Conclusions

3. METHODES IMMUNO-ELECTROPHORETIQUES

3.1. Généralités

3.2. Techniques

3.3. Résultats

3.3.1. Fractions plasmatiques

3.3.2. Fractions "tissulaires"

3.4. Conclusions

4. METHODES COMPLEMENTAIRES

4.1. Généralités

4.2. Techniques et Résultats

4.3. Conclusions

CHAPITRE II

TRAVAUX PERSONNELS

METHODES DE SEPARATION et D'IDENTIFICATION

1. ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

1.1. Raisons du choix de cette Méthode

1.2. Considérations Théoriques

1.2.1. Aspect structural

1.2.2. Influence de divers paramètres

1.2.3. "Disc Electrophoresis"

1.3. Méthodes et techniques

1.3.1. Etape préliminaire

1.3.2. Réactifs

1.3.3. Mode Opératoire

1.3.3.1. Préparation des solutions

1.3.3.2. Préparation de l'échantillon

1.3.3.3. Pose de l'échantillon

1.3.3.4. Migration électrophorétique

1.3.3.5. Coloration

1.3.3.6. Décoloration

1.3.4. Discussions

1.4. Résultats

2. IDENTIFICATION DES FRACTIONS SÉRIQUES

2.1. Méthode : Immuno-Diffusion

2.1.1. Technique sur gel entier

2.1.2. Technique sur gel découpé transversalement

2.2. Résultats

2.3. Discussion

3. ESSAI D'IDENTIFICATION DE CERTAINES FRACTIONS TISSULAIRES

3.1. Définition du Problème

3.2. Préparation de l'anti L.C.R.

3.2.1. Protocole de l'immunisation

3.2.2. Contrôle des réponses immunitaires

3.2.2.1. Méthode de double diffusion

3.2.2.2. I.E.P. Modifiée par SHEIDEGGER

3.2.2.3. Absorption des anti sérums

3.2.3. Résultats

3.3. Méthodes d'identification

3.3.1. Méthode des inclusions

3.3.2. Méthode avec immuno absorbants

3.3.2.1. Principe

3.3.2.2. Technique

3.4. Résultats

3.5. Discussion

CHAPITRE III ESSAI DE CLASSIFICATION DES PROFILS PROTEIQUES DU L.C.R.

1. INTRODUCTION

2. CLASSIFICATION

2.1. Terminologie

2.2. Profil "Normal"

2.3. Profil "Transudatif"

2.3.1. Caractéristiques

2.3.2. Aspects cliniques

2.4. Profil "Gamma"

2.4.1. Caractéristiques

2.4.2. Aspects cliniques

2.5. Profil "Inflammatoire"

2.5.1. Caractéristiques

2.5.2. Aspects cliniques

2.6. Profil "Dégénératif"

2.6.1. Caractéristiques

2.6.2. Aspects cliniques

2.7. Profils particuliers

3. DISCUSSION

CONCLUSIONS

ABREVIATIONS

Pour la commodité de l'exposé et pour éviter les répétitions nous avons utilisé un certain nombre d'abréviations :

L.C.R.	:	Liquide céphalo-rachidien
Anti S.H.N.	:	Sérum anti protéines sériques humaines
Anti L.C.R.	:	Sérum anti protéines du liquide céphalo rachidien
Anti L.C.R. absorbé	:	Sérum anti protéines du L.C.R. absorbé 48 h sur S H M
Coll.	:	Collaborateurs
Cm ³	:	Centimètre cube
S.H.N.	:	Sérum humain normal
mm	:	millimètres
V.	:	Volt
mA	:	milli Ampère
Ag-Ac	:	Antigène - Anticorps
ml	:	millilitre
I.M	:	Intra musculaire
Na	:	Sodium
Na Cl	:	Chlorure de Sodium
Lamba	:	Longueur d'onde
I-D	:	Immuno-Diffusion
I.E.P.	:	Immuno-Electrophorèse
H _p	:	Haptoglobuline
Cm	:	Centimètre
Gamma A ou IgA	:	Immuno-globulines A
Gamma M ou IgM	:	Immuno-Globulines M
Gamma G ou IgG	:	Immuno-Globulines G
P.A	:	Polyacrylamide
Tf 1	:	Transferrine ou Sidérophiline
Tf 2	:	Transferrine 2 ou fraction "Tau"
S.E.P.	:	Sclérose en plaque
Gc	:	"Group component"
Alpha 2 M	:	Alpha 2 Macroglobuline
Béta 1 Lipo	:	Béta 1 lipoprotéine
C'	:	Complément

C H A P I T R E I

TRAVAUX ANTERIEURS

METHODES D'ETUDE DES PROTEINES DU L.C.R.

1. METHODES DE FLOCCULATION

1.1. Techniques Qualitatives

Bien avant l'apparition de l'électrophorèse, les biochimistes disposaient déjà de plusieurs méthodes d'étude des protéines du L.C.R. et tout particulièrement de techniques de floculation permettant d'une façon plus ou moins grossière d'apprécier le rapport Albumine/Globulines.

La période de 1900 à 1912 fut marquée par l'apparition des réactions de NONNE-APELT utilisant une solution saturée de sulfate d'ammonium, de PANDY au Phénol à 10 %, de WEICHBADT et de TAKATA-ARA au sublimé, de NOGUCHI à l'acide butyrique.

Puis avec LANGE en 1912 apparaissent les réactions colloïdales dans le L.C.R. : réaction à l'or colloïdal, réaction du benjoin colloïdal de GUILLAIN, LAROCHE et LEHELLE, réaction à la gomme mastic de JACOBSTHAL, EMMANUEL et KAFKA, réaction à l'acide chlorhydrique-collargol de RIEBELING, réaction à la paraffine de KAFKA (50). Le deuxième groupe de technique présentait un avantage important, du fait de leur réalisation en galerie de dilution, de permettre plusieurs types de réponse qui essayaient de se superposer à la clinique.

1.2. Techniques Quantitatives

Dans ce paragraphe nous omettrons volontairement la description des techniques relatives au dosage des protéines totales

du L.C.R. Nous pensons qu'il s'agit là d'un problème très important en soi, mais pas dans une perspective d'identification qui est la notre.

Par contre nous rappellerons les méthodes de dosage qui déterminent la teneur en certaines fractions ou en certains groupes de fractions protéiques contenus dans le L.C.R. Une des plus anciennes, la méthode de Kafka-Samson fournit une estimation des globulines par précipitation avec une solution saturée de sulfate d'ammonium et appréciation volumétrique du précipité formé. Plus près de nous, ROBOZ et COLL. (91) en 1953, PAPADOPOULOS (83) en 1959, HANOK (45) en 1961 ont appliqué au L.C.R. le principe du dosage turbidimétrique des gamma-globulines précédemment établi par KUNKEL sur des sérums dilués. Vers 1960 ALAJOUANINE (1) applique au LCR la méthode de BURSTEIN (7) pour le dosage des Béta lipoprotéines, qui en présence de chlorure de magnésium forment avec le sulfate de dextran un trouble dont l'opacité peut être déterminée au photomètre.

Parallèlement aux méthodes chimiques apparaissent les méthodes immuno-chimiques : initialement KABAT et COLL. (1948) (49) déterminaient la teneur en azote du complexe Ag - Ac - qu'ils avaient précipité et isolé, par un micro-Kjeldahl . Ainsi durant ces dix dernières années avec l'apparition d'anti-sérums anti-fractions protéiques, toujours plus spécifiques et toujours plus nombreux, on a assisté à une généralisation du principe des dosages immuno-chimiques des protéines du L.C.R. Ce phénomène tient au fait que par rapport aux précédentes méthodes, ces dernières ont l'énorme avantage d'être en général simples, mais surtout précises et sélectives. C'est ainsi que GOODMAN et VULPE (1961) (41) FRICK (1963) apprécient le trouble développé par la réaction Ag-Ac effectuée en milieu liquide. Sur le principe de la double diffusion en agar d'OUCHTERLONY (82) ROSENTHAL (1962) (92) COLOVER (1963) (15) réalisent une technique permettant le dosage des protéines du L.C.R. A partir des années 1964-65 se sont imposées les techniques immuno-chimiques par diffusion radiale simple en gel d'agar, proposées par MANCINI (1963) (69). Quelques années plus tard, plusieurs auteurs appliquaient au L.C.R. l'électro-immunodiffusion, technique décrite par LAURELL (62) pour le sérum. Après ce bref rappel des si nombreuses techniques utilisées pour la détermination de telle ou telle fraction protéique du L.C.R., nous écouterons volontairement notre revue critique de ces méthodes qui, mis à part les techniques immuno-chimiques, sont pour la plupart tombées dans l'oubli et ne présentent plus guère qu'un intérêt historique.

1.3. Conclusions

En effet si les méthodes de floculation sont simples, elles sont par contre toujours empiriques. Les réactions colloïdales pour intéressantes qu'elles fussent en leur temps, ont cédé

la place actuellement aux techniques immuno-chimiques dont les informations sont spécifiques et précises. C'est ainsi que le dosage des gamma globulines par immuno-diffusion a supplanté largement les techniques utilisant le sulfate de zinc. Par contre, nous avons consacré une place plus importante aux études électrophorétiques et immuno-électrophorétiques qui ont été réalisées jusqu'à ce jour, puisqu'elles se trouvent au coeur même de notre sujet.

2. METHODES ELECTROPHORETIQUES

2.1. Considérations Générales

Sous la dénomination d'électrophorèse, TISELIUS utilisa pour la première fois en 1937 le déplacement de particules dans un champ électrique en vue de la séparation de molécules protéiques. Cette migration différente suivant la charge et le poids moléculaire des protéines, permettait d'obtenir un fractionnement des diverses solutions protéiques.

Initialement réalisée en veine liquide cette méthode fut très vite transposée par de nombreux auteurs à des supports solides. Les protéines séparées sont alors évaluées après coloration, soit directement sur le support, soit après élution et dosage colorimétrique.

Nous analyserons successivement les différentes méthodes électrophorétiques chacune originale par le support utilisé en montrant chaque fois les avantages, les inconvénients et les résultats acquis avec ces techniques dans l'étude des protéines du L.C.R.

Quand il s'agit d'électrophorèse du L.C.R., liquide pauvre en protéines, pratiquement toutes les techniques sauf la polyacrylamide et certaines techniques récentes utilisant l'acétate de cellulose réalisent un enrichissement préalable du liquide en protéines. Nous allons donc en premier lieu examiner ce problème.

2.2. Méthodes d'enrichissement en protéines du L.C.R.

Après les premiers essais d'enrichissement de ROSSI et SCHNEIDER (93), puis ceux d'EATON (26) et GARDNER (26), apparut la nécessité d'une déminéralisation préalable à toute concentration ; en effet l'abondance de sels peut nuire à une bonne séparation électrophorétique.

2.2.1. Techniques de Déminéralisation

2.2.1.1. Procédés Physiques

La dialyse, soit à température

ordinaire, soit à basse température à travers une membrane d'acétate de cellulose, comme l'ont décrit ESSER (29) puis GRIES (43) en 1953.

La dialyse peut se faire à la pression normale ou sous hyperpression, réalisant en même temps une concentration du liquide contre une solution hypertonique colloïdale du type DEXTRAN (H. LABHART et W. SCHWEITZER) (57). L'ultra-filtration permet également une déminéralisation et une concentration simultanées. (GRIES) (43).

2.2.1.2. Procédés Physico-Chimiques

Certains auteurs comme BUCHER et COLL. (6) suggérèrent de précipiter les protéines à basse température par l'acétone pour éviter leur dénaturation. Il suffit ensuite de redissoudre le culot dans un minimum de solution saline.

2.2.2. Techniques de Concentration

Nous avons déjà évoqué précédemment les procédés de dialyse et l'ultra-filtration qui permettent dans certains cas de dessaler et de concentrer en même temps. Il faut ajouter à celles-ci les techniques d'évaporation sous vide utilisées par ESSER et COLL. (29), puis par LATERRE (60). La lyophilisation fut décrite et utilisée par EATON ET GARDNER (26), méthode élégante pour qui dispose d'un lyophilisateur, mais possédant l'énorme inconvénient de détruire certaines liaisons lipo-protéiques ; phénomène bien mis en évidence par ROUPERT (Thèse Paris 1956) (94). Pour en terminer avec ce problème, il faut souligner que si, de nombreux auteurs comme LEMMEN (63) GOA et LATERRE (40) ont utilisé ces techniques, ils ont toujours recommandé l'utilisation préférentielle de certaines, nous montrant bien ainsi les inconvénients et les risques d'un tel prétraitement du L.C.R., que sont la dénaturation ou la modification des charges de telle ou telle fraction.

2.3. Electrophorèse sur Papier

2.3.1. Généralités

Cette technique partant de solutions concentrées des protéines, suppose donc résolu le problème de la concentration.

Quant à la technique électrophorétique proprement dite, la plupart des auteurs comme ROUPERT (94), METAIS (76), et ROSSI (93) se réfèrent à la technique de W. GRASSMANN (42) et K. HANNIG (42) pour le sérum.

2.3.2. Techniques

On réalise une migration en chambre humide sous 110-130 v , en tampon véronal pH 8,6, pendant 16 à 17 heures, coloration à l'amido schwartz, établissement des profils au densitomètre, analyse du tracé suivant la technique du WIEDMAN (102) et planimétrie. Les résultats sont exprimés en pourcentage relatif.

2.3.3. Résultats

Cette technique permet de révéler 6 fractions ; en effet, si la plupart des auteurs de cette époque admettent d'une manière à peu près unanime la présence des mêmes constituants protéiques dans le L.C.R. que dans le sérum, certains reconnaissent également la présence d'au moins une fraction supplémentaire appelée " R₀ " 1,2 à 1,3 fois plus rapide que l'albumine (GERVAIS Thèse Paris). L'électrophorèse sur papier permet ainsi de distinguer suivant leur position sur la bande, de l'anode à la cathode : la fraction " R₀ " appelée pré-albumine, l'albumine, les Alpha 1 globulines, les Alpha 2 globulines, les Beta globulines et les gamma globulines. Les résultats de chaque fraction protéique sont exprimés en pourcentage relatif. (Confère. tableau p. 23)

En outre, dès cette époque, différents auteurs décèlent la présence d'une fraction intermédiaire "Béta - Gamma" par la lecture densitométrique des bandes colorées et leur décomposition en courbes de Gauss. Par contre cette fraction est difficilement visible sur la bande elle-même.

2.3.4. DISCUSSION

Le manque de pouvoir résolutif du papier est l'une des critiques les plus justifiées de cette technique. De plus le papier est un support peu propre à l'obtention d'un profil électrophorétique à partir des diagrammes colorés. En outre, un tel rachiprotéinogramme, d'après METAIS (76), demande au minimum 10 ml de L.C.R., une concentration obligatoire et un délai d'obtention de 2 à 3 jours.

Si le délai dans ce type d'investigation n'est pas un impératif majeur, par contre le manque de résolution du papier et l'important volume de L.C.R. à utiliser ont fait perdre peu à peu à cette technique la place qu'elle occupait il y a une quinzaine d'année.

2.4. Electrophorèse sur Gel d'Agar

2.4.1. Généralités

La méthode fut introduite par WIEME en 1959 (103) dans son ouvrage "Studies on agar gel Electrophoresis", mais c'est à LOWENTHAL en 1962 (65), puis CANAL (9), CLAUSEN (14) et enfin LATERRÉ en 1965 (60) que revient le mérite d'avoir largement exploité cette technique dans l'étude des protéines du L.C.R.

En effet cette méthode, qui permet une séparation de fractions plus nombreuses que le papier, améliora considérablement l'état de nos connaissances sur ce sujet. Pour qu'elle prenne tout son intérêt, cette technique réclame pour sa réalisation un L.C.R. préalablement concentré, problème envisagé précédemment et sur lequel nous ne reviendrons pas.

2.4.2. Techniques

Nous en rappellerons ici brièvement les modalités essentielles (Ref. WIEME) : utilisation d'un agar noble Dif-co à 0,9 % en tampon véronal pH = 8,4, de force ionique 0,05, une épaisseur du gel de migration d'environ 1,5 mm, une tension aux bornes de 140 v. avec une intensité de 10 mA, une durée de migration de 20 à 25 minutes. La migration s'effectue sur un dispositif thermostaté empêchant un échauffement trop important de la gélose, ce qui permet ainsi une meilleure séparation. Après électrophorèse, on fixe les protéines par une solution alcool-acétique, on sèche à 37° C et on colore par le noir amide. L'excès est décoloré par une solution d'acide azétique 5 %. La mesure des concentrations relatives de chaque fraction peut être obtenue soit par une méthode d'élution, soit par une méthode densitométrique, faisant appel à un appareil à intégration automatique qui chiffre en pourcentage chaque pic du profil électrophorétique. Il faut ici souligner la discordance importante dans les résultats donnés par ces deux types de méthode et tout particulièrement dans l'évaluation de l'albumine.

LATERRÉ (60) rapporte dans une étude comparative des méthodes d'enregistrement et des méthodes d'élution, que les valeurs relatives d'albumine fournies par des appareils à enregistrement rapide sont toujours trop basses par rapport aux valeurs trouvées par élution. Par contre un appareil à enregistrement lent, nécessitant trois balayages densitométriques successifs, fournit une assez bonne correspondance avec les valeurs déterminées par l'élution. Néanmoins il souligne que, quelque soit la technique utilisée, en ce qui concerne l'albumine, il y a toujours une surestimation par rapport aux résultats fournis par l'électrophorèse sur papier. Ceci s'explique par l'extrême affinité des colorants pour l'albumine.

Aussi faut-il se contenter d'approximation et rester très critique dans l'estimation quantitative des électrophorogrammes en agar du L.C.R.

2.4.3. Résultats

Le profil électrophorétique du L.C.R. normal fourni par LATERRE (72) et MANUEL (72-73) montre de l'anode à la cathode sept groupes de fractions :

- La pré-albumine de SCHULTZE riche en tryptophane , fraction déjà mise en évidence sur papier, sa valeur relative est nettement plus élevée dans le L.C.R. que dans le sérum; elle représente en moyenne 4,6 % des protéines totales du liquide spinal.

- L'albumine, fraction la plus importante du sérum et du L.C.R., est estimée en moyenne à 62,9 %.

- Les Alpha 1 Globulines, sommet en général un peu plus élevé dans le L.C.R. que le sérum, représentent 5,9 % des Protéines.

- Les Alpha 2 Globulines dont le taux moyen est de 6,5 %, ont très souvent une mobilité inférieure à celle des Alpha 2 sériques.

- Les Beta Globulines, Ces fractions avaient déjà attiré l'attention des auteurs par leur disposition en deux bandes peu différenciées sur papier, mais nettement individualisées sur agar. La bande la plus anodique correspond presque en totalité à la transferrine et représente 10,9 % des protéines totales. La deuxième bande dénommée "Tau Fraktion" par BUCHER et COLL (6), identifiée dès 1959 par BURTIN comme étant une "deuxième sidérophilline" grâce à l'immuno-électrophorèse qui montre une double courbure du trait de précipitation de la transferrine, suggérant l'identité immunologique de ces deux bandes. A la suite des travaux de PETTE et STUPP en 1960 (87) et de PARKER et BEARN en 1962 (84) utilisant la neuramidase, il apparut très nettement que la fraction "Tau" était une transferrine incomplète à laquelle manquait cinq groupements d'acide sialique. La valeur moyenne étant estimée à 4,2 % des protéines totales.

- La zone des Gamma Globulines représente environ 6 à 8 % des protéines totales. Dans la zone lente on peut voir quelquefois une ligne appelée "Post gamma" ou "Delta aT" par LATERRE.

2.4.4. Discussion

Notre critique portera essentiellement sur deux points : d'une part la concentration des protéines et d'autre part le pouvoir de résolution de la gélose. En effet cette méthode impose obligatoirement une concentration du L.C.R. et

nous ne reviendrons pas sur les inconvénients importants, à notre avis, de ce procédé. De plus si le pouvoir de résolution de la gélose est supérieur à celui du papier ou à celui de l'acétate de cellulose de type "Oxoid", il ne l'est jamais à celui obtenu en gel de polyacrylamide que nous étudierons un peu plus loin.

2.5. Electrophorèse sur acétate de Cellulose

2.5.1. Généralités

L'électrophorèse sur gel de gélose a permis de faire avancer considérablement nos connaissances sur les protéines du L.C.R. Parallèlement d'autres auteurs en raison probablement des servitudes de cette technique, pratiquent l'électrophorèse du L.C.R. sur bandes d'acétate de cellulose : BRACKENRIDGE (1962) (5), RICE (89), et BLEAKNEY (1964) (89) ICOU (53), KRAUSE (55), KAPLAN (1967) (52), WERNER (1969) (IOI), NEUZIL et MAURIN (1970) (79). Il nous faut signaler ici que la dénomination commune "acétate de cellulose" recouvre en fait une variété de bandes qui ne nous semblent pas toutes posséder les mêmes qualités dans leur pouvoir de résolution. Quoiqu'il en soit, le L.C.R. n'échappe pas ici non plus à une technique de concentration.

2.5.2. Techniques (Ref. BRACKENRIDGE)

Les bandes sont imprégnées d'un tampon très véronal pH = 8,9. On opère sous une tension de 220 v. avec ampérage constant (0,75 m A par centimètre de largeur de bande) pendant une période de 30 minutes environ. La coloration des protéines est réalisée par immersion dans un mélange noir amide, méthanol, acide acétique et eau. La décoloration est obtenue après lavages répétés par une solution méthanol, acide acétique, diacétone-alcool. Les différentes fractions de l'électrophorégramme sont évaluées par densitométrie.

2.5.3. Résultats

La qualité des résultats diffère suivant le type d'acétate de cellulose utilisé. Avec des bandes "Oxoid" WERNER (IOI) obtient 7 à 8 fractions, mais reconnaît que leur séparation reste médiocre. Le spectre électrophorétique fait apparaître une bande préalbumine, une bande albumine incomplètement séparée des Alpha I globulines, une bande Alpha 2 globulines lente, une bande Beta 1 globulines dont la mauvaise séparation avec la fraction "Tau" empêche toute évaluation isolée de cette dernière, une bande Gamma globulines, parfois il existe aussi une bande supplémentaire "post Gamma globulinique" juste devant le point de dépôt.

NEUZIL et MAURIN (79) utilisant les bandes

"Cellogel" et les bandes "Sepraphore III" obtiennent une séparation minimum en 7 fractions pour les L.C.R. normaux. La séparation est ici plus tranchée. Les valeurs relatives en pourcentage de chaque fraction sont mentionnées dans un tableau (page 23). Enfin il nous faut signaler une méthode proposée en 1964 par RICE et BLEAKNEY (89) qui réalisent une électrophorèse du L.C.R. sur acétate de cellulose sans concentration préalable ; malgré l'intérêt apparent de cette technique, elle est en fait décevante, l'électrophorégramme^{ne} montre en effet que 4 fractions, et la plupart des auteurs utilisant l'acétate reconnaissent sa médiocrité.

2.5.4. Discussion

Cette méthode nous a paru intéressante à condition d'utiliser des supports de bonne qualité. L'acétate de cellulose fournit une séparation des protéines du L.C.R. au moins aussi bonne, sinon meilleure, que la gélose. Elle présente en outre l'avantage d'une réalisation plus simple et plus rapide que les techniques en gélose, en polyacrylamide ou en amidon. Mais comme la plupart de ces techniques, elle utilise aussi des échantillons de L.C.R. préalablement concentrés.

2.6. Electrophorèse sur gel d'Agarose

2.6.1. Généralités

A l'inverse de ce que nous avons constaté pour les techniques utilisant l'agar ou l'acétate, peu d'auteurs, à notre connaissance, ont jusqu'ici utilisé ce support dans l'étude électrophorétique des protéines du L.C.R. Cela nous étonnera peu, si l'on sait que l'agarose dérivé de la gélose par suppression de ses groupements Co OH et So_3^- entraînant une diminution du courant d'électroendosmose qui n'améliore pas son pouvoir résolutif.

2.6.2. Techniques

Nous mentionnons ici la technique décrite par ELEVITCH et FRANKLIN en 1966 (28), appliquée par WERNER (101) en 1969 au L.C.R.

On utilise un gel d'agarose en tampon véronal 0,05 M pH = 8,8. On opère sous une tension de 140v. pendant une heure. Après migration les protéines sont fixées pendant dix minutes par l'acide acétique 5 % ; séchage à 50° C, coloration au noir amide et évaluation des différentes fractions révélées par densitométrie.

2.6.3. Résultats

Nous rapportons ici les indications fournies par WERNER en 1969 (IOI) : l'électrophorégramme obtenu est sensiblement différent des images obtenues par ce même auteur sur acétate de cellulose. D'une part les profils révèlent une meilleure séparation que sur acétate type "Oxoid" et d'autre part un plus grand nombre de fractions : une Alpha globuline supplémentaire apparaît parfois entre l'albumine et la bande Alpha I globulines. La Fraction "Tau" est très nettement détachée de la bande Béta I Globulines. Quant à la résolution dans la zone des Alpha-globulines, elle est intermédiaire entre celle obtenue sur acétate et celle obtenue sur polyacrylamide. Parfois WERNER décrit la présence d'une bande "Post gamma" qui se trouve légèrement en position cathodique par rapport au point de dépôt, comme par ailleurs les gamma globulines.

2.6.4. Discussion

Pour intéressante qu'elle soit, cette méthode n'apporte aucun élément nouveau par rapport à la technique utilisant l'agar. Et, comme cette dernière, elle demande une réalisation minutieuse, sans pour autant éviter la concentration préalable du L.C.R.

2.7. Electrophorèse sur gel d'Amidon

2.7.1. Généralités

Si l'encombrement de la molécule ne jouait qu'un rôle restreint par rapport à sa charge électrique dans l'électrophorèse sur papier ou sur acétate de cellulose, il devient au contraire un facteur important dans la technique en gel d'amidon introduite par SMITHIES en 1955 (99), modifiée par FINE en 1958 (33-34), appliquée au L.C.R. par PERT et KUTT (86) la même année, puis utilisée par MANUEL dans sa thèse de sciences physiques en 1965 (71). Avec ce type de technique, FINE (34) insiste sur l'influence capitale de la composition des tampons pour de bonnes conditions d'exploitation de la technique, ceci étant lié à l'effet de filtration du gel d'amidon.

2.7.2. Techniques

Nous rapportons la technique utilisée par MANUEL (71). Il obtient un gel par agitation énergique à froid puis à chaud de l'amidon dans le tampon choisi. En effet les tampons qui peuvent être utilisés sont de trois sortes : tampon continu borate-borate, tampon discontinu tris-borate, tampon discontinu glycine-soude. Quel que soit le système utilisé, il y a toujours le tampon gel et le tampon cuve.

Le Gel est disposé sous une épaisseur de 6 mm, condition d'une migration régulière, sur un moule approprié.

L'auteur préconise l'utilisation de cuves à pont qui permettent un contact direct entre le gel d'amidon et le tampon de la cuve. On fait migrer trois heures sous une différence de potentiel de 170v. Le démoulage est effectué en solution d'acide acétique 5 % pour éviter toute rupture du gel. Il est ensuite découpé en deux tranches de 3 mm. chacune. On garde la partie inférieure qui est colorée à l'Amido-Schwarz pendant 30 minutes, il est ensuite décoloré dans des bains successifs d'acide acétique à 5 % de 24 heures chacun.

Pour l'estimation quantitative des différentes fractions, il est possible de rendre le gel à la fois transparent et manipulable : on met le gel dans une série de bains décolorants d'acide acétique 5 % et de glycérol bidistillé à 10 %. Après décoloration, séchage du gel à l'étuve à 70° C pendant 3 heures, la dessiccation complète est obtenue en 24 à 48 heures, le gel ressemble alors à une feuille de plastique, souple, transparente, se prêtant aux analyses photométriques.

2.7.3. Résultats

De l'anode vers la cathode on trouve selon la nomenclature de SMITHIES (99) :

- Une fraction appelée "pré-albumine rapide" correspondant à la fraction " Ro " riche en tryptophane
- Une fraction "pré-albumine lente" identifiée à l'orosomucoïde Alpha I.
- Une zone albumine
- Une zone de coloration diffuse appelée bande " fast Alpha 2-Globulines"
- Une ligne importante dans la zone "Béta C de SMITHIES Correspondant à la sidérophilline.
- Une ligne aussi intense que la précédente et qui correspond à la fraction "Tau"
- Une ligne dans la zone dite "Slow Alpha 2" et qui correspond à l'Alpha 2 macroglobuline .
- En retrait du point de dépôt on trouve une zone Gamma globulines : la Gamma A et la Gamma M ne sont jamais retrouvées dans le L.C.R. normal, les Gamma G sont présentes, mais en quantité inférieure en pourcentage relatif à celles du sérum.
- Enfin dans la zone "Post Gamma" globulines, toujours en retrait du point de dépôt, est retrouvée d'une façon constante une fraction très nettement homogène et différenciée.

2.7.4. Discussion

S'il n'est pas possible de critiquer le pouvoir résolutif du gel d'amidon qui semble-~~t~~-il est excellent, il nous a paru important de signaler que si cette méthode est extrêmement valable pour un travail de recherche, par contre son utilisation dans une investigation de routine reste limitée à quelques spécialistes tant les conditions de réalisation sont longues, délicates et minutieuses.

2.8. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

2.8.1. Généralités

Avec l'introduction du gel de polyacrylamide selon la technique du "Disc électrophoresis" par ORNSTEIN (80) et DAVIS (81), on peut dire que l'on a enfin apporté une solution au problème de la concentration du L.C.R. pour son étude électrophorétique. Nous ne nous étendons pas ici sur les caractéristiques et les avantages de cette technique que nous étudierons plus en détail au cours de notre deuxième chapitre.

Très rapidement on vit de nombreux auteurs tirer un profit immédiat de cette technique à l'étude des protéines du L.C.R. : en 1965 MONSEU et COLL (78) en 1966 EVANS et COLL, en 1967 FELGENHAUER et COLL (32) en 1968 DELANK (20) en 1969 DIESSNER (25) puis CUMINGS en 1970 (16) pour ne citer que les plus importants.

2.8.2. Techniques

Les gels de P.A sont obtenus par copolymérisation dans des tubes de verre de 4 à 5 mm. de diamètre et de 4 à 5 cm. de longueur. A l'intérieur de ces cylindres, on superpose trois types de gels, dans l'ordre : gel de séparation, gel de rassemblement et gel échantillon. Le gel inférieur est à 7 % de polyacrylamide, le gel intermédiaire est à 5 % et on mélange au gel échantillon un certain volume de L.C.R. de façon à réaliser une pose de 150 à 200 μ g de protéines. On utilise un tampon tris acide acétique pH 8,3. L'électrophorèse est effectuée avec une intensité de 3,5 mA par cylindre.

Après migration, les gels sont colorés une heure dans le noir amide 1 % puis décolorés par des bains successifs d'acide acétique, la lecture des bandes s'effectue par densitométrie.

2.8.3. Résultats

Selon les auteurs, le nombre de bandes séparées est extrêmement variable, on peut admettre une moyenne de 14 bandes avec des variations extrêmes de 10 à 18 bandes.

Vu le nombre important de fractions, la plupart des auteurs reconnaissent qu'il est très difficile de comparer ces résultats à ceux précédemment obtenus en agar. Par contre MONSEU et COLL sont arrivés à établir une comparaison avec les fractions séparées sur amidon en reprenant la terminologie de SMITHIES pour nommer les différentes fractions séparées. Mais d'autres auteurs en particulier germaniques ont établi une terminologie propre pour localiser ces fractions. Ils se réfèrent aux fractions classiquement connues : Albumine et

transferrine, et à partir de ces dernières, ils établissent un répertoire des fractions : "post Albumine" 1.2.3.etc. et de la même façon dans la région des Béta globulines ils parlent des "post transferrines" 1.2.3. etc.

De l'anode à la cathode on trouve la "pré-albumine", l'albumine, la région "post Albumine", qui comprend 3 à 5 fractions selon les auteurs,, puis la Béta globuline constituée par la transferrine, une zone "post transferrine" de 2 à 3 fractions, enfin une zone gamma globuline constituée de 3 à 5 fractions : un région IgG, IgA, un région polymère de l'haptoglobuline ; à l'entrée du gel, on trouve un mince zone dite "macro-globulines".

L'identification des fractions a pu souvent être réalisé pour une migration parallèle sur un gel identique avec des préparations purifiées d'albumine, d'IgG ou de transferrine.

L'haptoglobuline a pu être repérée grâce à sa réactivité avec la benzidine, les glycoprotéines par leur coloration avec la fuschine bisulfitee et les lipoprotéines par le noir soudan, colorant des lipides.

Une autre tentative d'identification a pu être également réalisée par EVANS et QUICK avec la détermination des mobilités de chaque fraction par rapport à celle de la transferrine :
$$R_F = \frac{\text{migration protéine}}{\text{migration transferrine}}$$

C'est ainsi qu'ils localisent dans la zone "Béta" la transferrine C, l'haptoglobine, et la céruloplasmine. De la même façon, il repère l'Alpha 2 macroglobuline à l'entrée du gel, dans la zone gamma, les fractions "7S immunoglobulines", et une zone de glycoprotéines. Par contre, dans les zones intermédiaires "Béta-Gamma" et Albumine-Transferrine" ils localisent certaines fractions sans les identifier.

La détermination quantitative de chaque fraction sera mentionnée dans le tableau général avec les résultats des principaux auteurs. Tableau, page 23).

2.8.4. Discussions

De cette rapide revue bibliographique des principales études sur les protéines du L.C.R. par électrophorèse en gel de polyacrylamide, nous avons dégagé deux notions essentielles. D'une part, ce support offre un pouvoir de résolution supérieur à tous ceux précédemment décrits ; 18 fractions sont ainsi séparées par DELANK et COLL. (20), d'autre part, le nombre important de fractions séparées entraîne un problème difficile d'identification. C'est pourquoi les auteurs s'attachent le plus souvent à localiser les fractions par leur mobilité comparée à celle des mêmes fractions du sérum ; méthode qui à notre avis ne peut en aucun cas prétendre à une identification certaine.

AUTEURS	Tech. : nique	Préalb. : %	Alb. : %	Alpha I : Région A	Alpha 2 : Région A	Béta : Région B	Tau : Région B	Gamma : Région G
BRACKENRIDGE	A.C	4,2-10,2	40,9-58,6	2,8-9	4,8-12,4	9,2-14,8	4,7-10,2	5,5-13,1
BUCHER et Coll.	P	4,4 ⁺ 0,8	49,7 ⁺ 1,4	15,4 ⁺ 0,9		11,5-0,9	8 ⁺ 0,7	11 ⁺ 0,7
GRIES et Coll.	P	4,3 ⁺ 1,6	51,3 ⁺ 5,5	5,8 ⁺ 1,2	8,4 ⁺ 2,4	17,2 ⁺ 3,2	6,8 ⁺ 1,8	6,3 ⁺ 1,7
KAPLAN	A.C	4,9 ⁺ 1,2	61,5 ⁺ 5,3	4,5 ⁺ 1,4	6,7 ⁺ 1,8	13,7 ⁺ 3,6		8,8 ⁺ 2,6
LATERRE	A	4,6-2,3	62,9 ⁺ 10,1	5,9 ⁺ 2,2	6,5 ⁺ 2,3	10,9 ⁺ 3,6	4,2 ⁺ 1,7	4,7 ⁺ 2,7
LOWENTHAL	A	2 - 7	55 - 66,9	5-8,9	6 - 9,9	7 -10,9	3 - 4,9	4 - 12,7
METALS	P	0 - 4,4	51,3-60	4,7-8	7,5-11,6	9,7 - 18		5,6-10
NEUZIL et Coll.	A.C	3 - 7	50 - 70	3 - 7	4 - 8	8 - 14	3 - 8	3 - 10
RICE et Coll.	A.C		54,6 ⁺ 6	9,5 ⁺ 3,6		19,5 ⁺ 2,5		16,4 ⁺ 2,9
WINDISCH et Coll.	A.C	3,7-6,9	56,8-72	2,3-6,2	3-10,7	8,8 - 18,6		4,8-13,9
DELANK	P.A	5,17	61,3	9,9		14,82		11,34
EVANS et QUICK	PA	5,5 ⁺ 0,04	50 ⁺ 1,6	9 ⁺ 0,3		20 ⁺ 0,7		15 ⁺ 0,7
FELGENHAVER	PA	3 - 10,1	56,5-77	5,8 - 11,4		9,2 -19,2		10,4-21,6
Résultats personnels	PA	8 - 10	45 - 50	5,5 - 11,5		14-18	7-9	8 - 10

C'est ainsi que deux fractions de mêmes tailles ou de mobilités peu différentes peuvent se chevaucher ou se superposer.

Aussi nous avons tenté par des techniques appropriées un essai d'identification immunologique.

2.9. CONCLUSIONS

Après cette revue des techniques électrophorétiques utilisées jusqu'à ce jour dans l'étude des protéines du L.C.R., on peut constater que l'électrophorèse sur papier à son époque, a eu le mérite d'apporter une première solution au dénombrement des fractions protéiques du L.C.R. Ce support, comme on l'a vu, a trouvé rapidement ses limites dans son mauvais pouvoir résolutif.

3. METHODES IMMUNO-ELECTROPHORETIQUES

3.1. Généralités

L'I.E.P. fut introduite initialement par GRABAR et WILLIAMS (37). Cette méthode s'effectue en deux temps, une migration électrophorétique avec comme support initial un gel d'agar, et une révélation immunologique des fractions ainsi séparées par un antisérum. Il est possible par ce moyen de différencier de nombreuses autres fractions protéiques préalablement dissociées par l'électrophorèse en gélose. Ce même genre d'investigation peut être également réalisé à partir d'électrophorèse obtenue sur d'autres supports, tels l'amidon ou le polyacrylamide, moyennant certains artifices techniques que nous envisagerons plus loin.

3.2. Techniques

Nous décrivons la micro-méthode de SHEIDEGGER (95), qui nous a paru la plus classiquement utilisée. Nous ne reviendrons pas sur la partie électrophorétique qui ne diffère de celle décrite précédemment (page 14) que par la durée de migration d'une heure au lieu de vingt minutes.

Ce premier temps réalisé, on découpe parallèlement à l'axe de migration des protéines des rigoles dans lesquelles on dispose l'antisérum. On laisse ainsi diffuser pendant 24 heures en chambre humide. Après ce laps de temps, on arrête la diffusion par un bain de Cl Na de 3 heures, suivi d'un second de 24 heures. On effectue ensuite un lavage de la gélose par un bain d'une heure dans l'eau distillée. Pour terminer on sèche la préparation que l'on colore, puis décolore d'une façon tout à fait identique à celle utilisée pour l'électrophorèse en agar.

3.3. Résultats

3.3.1. Fractions Plasmatiques

Sous l'appellation "fractions plasmatiques" nous désignons les protéines révélées par un sérum anti SHN. Nous rapportons ici les résultats obtenues par MANUEL et LATERRÉ en 1966 (72-73) puis confirmés dans leur ensemble par MARAVI en 1967 (74).

De l'anode à la cathode on trouve :

- Une zone pré-albuminique qui révèle à l'I.E.P. une seule ligne de précipitation, correspondant à la pré-albumine ou "tryptophan rich pré-albumin" selon la dénomination anglo-saxonne.
- L'albumine dont la mobilité semble plus importante que celle du sérum, se trouve à un taux toujours supérieur ou égal à celui des globulines, 50 à 60 % des protéines totales.
- La zone des Alpha 1 globulines révèle trois lignes de précipitation. L'une correspondant à l'Alpha 1 lipoprotéine décrite pour la première fois par DENCKER et SWAHN en 1961 (23) qui avait discuté la possibilité d'une hétérogénéité de cette fraction dans le L.C.R., fait aisément explicable par la très grande variabilité de sa mobilité qui peut aller de la pré-albumine à la zone des Alpha 1 globulines. Une autre, l'Alpha 1 3-5 glycoprotéine encore nommée Alpha 1 antitrypsine, fut isolée du sérum par SCHULTZE et coll. en 1962 (97). La troisième, le séromucoïde Alpha 1 ou orosomucoïde Alpha 1 fut particulièrement étudiée en 1961 par GOODMAN et coll. (41)
- La zone des Alpha 2 globulines présente comme particularité d'avoir bien souvent une mobilité inférieure à celle des Alpha 2 sériques. Le rapport Alpha 1/Alpha 2 est de l'ordre de 1, c'est à dire le double de celui du sérum. L'I.E.P. révèle ici 4 fractions. une ligne très allongée près de la gouttière de l'immunosérum, isolée et dénommée Alpha 2 H.S. par SCHULTZE (97) dans le sérum. Une ligne correspondant aux polymères des haptoglobines de type 2-2 et de type 2-1, ou au monomère du type 1-1 ; fractions dont la réalité fut très bien explicitée par BLAU et Coll en 1963 (4). Une ligne correspondant à la ceruloplasmine identifiée par JENSEN en 1963 (48) et enfin une dernière ligne représentée par l'Alpha 2 macroglobuline (Alpha 2 M) étudiée par DENCKER en 1961 (23) et ROSENTHAL en 1962 (92)
- La zone de Béta-Globulines comporte un minimum de trois arcs de précipitation. En premier lieu la transferrine et sa fraction "Tau" qui donnent un arc double courbure et dont le problème a déjà été évoqué. La Béta 1 AIC globuline de position Béta 1, Béta 2 ou intermédiaire, fut identifiée comme un constituant de C¹ par CLAUSEN en 1960 (14), BAMMER en 1963 (3) et FIRNHABER (35) l'année suivante. Enfin on trouve dans cette zone l'hémopexine et probablement des Béta 2 particulières déjà

mal connues dans le sérum comme les Béta 2 K et Béta 2 X glycoprotéines.

- La zone des Gamma globulines montre une ligne de précipitation identifiée aux IgG. Ni l'IgA, ni l'IgM ne sont retrouvées dans le L.C.R. normal par LATERRE et MANUEL en 1966 (72). Par contre des travaux plus récents semblent indiquer non seulement la présence d'IgA pour CUMINGS (16) mais encore celle de chaînes légères pour LINK (64).

3.3.2. "Fractions Tissulaires"

Sous l'appellation "fractions tissulaires" nous rapportons ici l'identification de protéines non plasmatiques mise en évidence par un sérum anti-L.C.R. absorbé sur S.H.N.

La présence dans ce liquide de protéines qualitativement différentes des protéines plasmatiques a été présentée pour la première fois par PRESS en 1956 (88), lors d'une étude sur les gamma globulines par les techniques à l'or colloïdal. Mais c'est à l'I.E.P. que nous en devons l'identification. D'abord considérées comme spécifiques du L.C.R., on s'aperçut rapidement que ces protéines pouvaient être retrouvées dans d'autres liquides biologiques.

LATERRE, HEREMANS, et CARBONARA en 1964 (59) les mirent en évidence parmi les protéines cérébrales solubles. L'analyse immuno-électrophorétique du L.C.R. réalisée avec divers immun-sérums anti-L.C.R. est susceptible de révéler de nombreux traits de précipitation qui n'ont pas leur homologue au niveau du spectre plasmatique. Il faut cependant insister sur le fait que la plupart de ces protéines existent à l'état de trace dans le L.C.R. normal et sont donc assez difficiles à mettre en évidence.

Néanmoins deux fractions ont cependant un taux plus élevé, et c'est principalement sur elles qu'ont porté de façon plus précise les travaux de ces dernières années. Il s'agit de deux fractions situées respectivement en position béta 2 et Gamma de l'électrophorèse sur agar. Leur dénomination varie selon les auteurs "Béta csF" (13), "Béta c" (67), "Béta trace" (47), "Béta 2 aT" (58) pour la fraction située en position béta 2, pour la deuxième fraction, nous retrouvons le même type d'appellation, "Gamma csF" (13), "Gamma c" (67), "Gamma Trace" (47), "post Gamma", "fast Gamma" (86), "Delta aT" (60).

Comme nous l'avons décrit au paragraphe 2.7.3. l'électrophorèse sur gel d'amidon ou sur agar permet de reconnaître une fraction "post Gamma" identifiée immunologiquement et dénommée "Delta a T" par LATERRE et coll. (60). Par contre la "Béta 2 a T" n'est révélée que par l'I.E.P., il est en effet impossible de la dégager de l'image électrophorétique globale; car elle interfère avec les protéines de type plasmatique de la région inter Béta-Gamma.

En accord avec les données de la littérature, LATERRE estime que l'ensemble des protéines non plasmatiques du L.C.R. normal ne dépasserait pas 5 % des protéines totales et que la "Delta aT" pour sa part représenterait 0,5 à 2 %.

3.4. Conclusions

Si la méthode immunologique comme nous l'avons constaté a permis de franchir un grand pas dans l'identification des fractions sériques, par contre ses limites ont été très vite atteintes quant à l'étude des protéines de types "tissulaires". Aussi a-t-il fallu recourir à d'autres formes d'investigation dont nous proposons ici un bref rappel dans un dernier paragraphe qui terminera notre revue des différentes techniques utilisées jusqu'à ce jour pour l'étude des protéines.

4. METHODES COMPLEMENTAIRES

4.1. Généralités

Ce sont toutes des méthodes qui ont pour but l'isolement d'un composé donné de façon à pouvoir étudier sa structure et ses propriétés physico-chimiques.

Nous limiterons cet exposé aux tentatives et aux caractérisations de la "Béta 2 a T" et la "Delta a T", car les efforts des chercheurs ont surtout porté sur l'étude de ces deux fractions.

4.2. Techniques et Résultats

En 1962 Mac PHERSON (67) isole la "Delta a T" par chromatographie sur D.E.A.E. cellulose technique reprise par LINK (64) qui lui, n'arrive pas à l'obtenir pure par ce procédé. Cette méthode combinée à un fractionnement sur hydroxyapatite fut également employée par HOCHWALD et THORBECKE En 1963 (47). Dans sa thèse de Sciences (1965) MANUEL associant la filtration sur séphadex G 200 à l'électrophorèse préparative sur un support inerte, le "Pévikon", en tampon véronal, isole une fraction "post gamma" de l'urine et montre sa parfaite identité immunologique avec le "Delta a T" du L.C.R.

En 1963 LATERRE et HERMANS (59) démontre que le "Delta aT" est une protéine assez fragile, et que ses conditions de conservation ont une influence sur sa mobilité électrophorétique et sur son taux dans le L.C.R.

Plus récemment LINK en 1967 (64) publie une étude extrêmement complète sur l'isolement, la structure, et le taux de "Béta trace" et de la "Gamma trace". C'est ainsi qu'il combine une double filtration sur séphadex G 200 et sur séphadex G 75 pour obtention de ces deux fractions. Le contrôle de la

pureté des fractions isolées fut toujours effectué par un anti-sérum approprié.

Pour LINK, la "Béta trace" constituerait une part significative des protéines du L.C.R., alors que la "gamma trace" occuperait une place moins importante du point de vue quantitatif. Ces résultats sont en discordance avec ceux obtenus par Mac PHERSON en 1965 (68) qui détermine la concentration de la "gamma trace" comme étant égale à 5 % des protéines du L.C.R. par une méthode immuno-chimique.

Ce problème semble-t-il n'a pas encore trouvé de solution à notre connaissance. LINK détermine à son tour par la technique de MANCINI (69) la concentration de la "béta trace" sur 22 échantillons de L.C.R. de sujets volontaires en bonne santé et trouve une valeur moyenne de 2,6 mg/100 ml. pour une protéinorachie moyenne de 0,36 g/100 ml.

Finalement la dernière partie de ces travaux nous fournit actuellement le poids moléculaire moyen de la "béta trace" qui est de 31.000 et celui de la "gamma trace" de 10.700.

Parallèlement, son étude sur ces fractions tissulaires et particulièrement sur la "béta trace" le conduit à découvrir lors d'un contrôle immunologique de la pureté dans la fraction isolée, la présence dans le L.C.R. de chaînes légères de type Kappa.

Cette fraction existe-t-elle réellement dans le L.C.R. à l'état libre ou au contraire la "Béta trace" possède-t-elle des sites antigéniques communs, avec les chaînes Kappa ; rien encore actuellement ne permet d'affirmer ou de confirmer l'une ou l'autre de ces hypothèses.

4.3. Conclusions

Ces différentes méthodes de séparation souvent extrêmement fines ont ainsi permis d'étudier d'une façon très complète certaines protéines du L.C.R. et d'en tirer leurs principales caractéristiques physico-chimiques.

C H A P I T R E I I

TRAVAUX PERSONNELS

METHODES DE SEPARATION ET D'IDENTIFICATION

1. ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

1.1. Raisons du choix de la technique

Parmi les nombreuses raisons que l'on peut évoquer pour ce choix, trois d'entre elles nous ont paru importantes et fondamentales pour la réalisation de ce travail.

Premièrement cette technique ne réclame que de petits volumes de L.C.R. qui ne dépassent jamais 0,6 ml. dans les cas les plus défavorables c'est à dire dans les liquides pauvres en protéines dont la teneur est inférieure à 0,15 g/l. Il n'est pas besoin ici de trop insister sur tout l'intérêt que représente la réalisation d'un faible prélèvement de L.C.R. quand on connaît tous les désagréments pour les patients des prélèvements trop importants, ou quand parfois on se trouve dans l'impossibilité d'obtenir des quantités de L.C.R. supérieures à 1 ou 2 ml. au cours de certaines ponctions lombaires difficiles.

Deuxièmement cette technique nous permet d'utiliser le L.C.R. sans concentration préalable, ce qui évite d'une part une manipulation supplémentaire, d'autre part une altération des protéines liquidiennes.

Troisièmement cette technique grâce au pouvoir de résolution élevé du gel de Polyacrylamide qui se présente comme un véritable tamis moléculaire, permet la séparation d'un grand nombre de fractions protéiques. Il en résulte des spectres électrophorétiques extrêmement fins qui mettent en évidence des modifications parfois minimes dans la composition

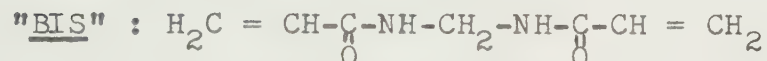
des protéines d'un échantillon de L.C.R.

1.2. Considérations Théoriques

1.2.1. Aspect Structural

L'acrylamide est une molécule, soluble dans l'eau, comportant une double liaison réactive, ref. WORK (105).

Ce monomère peut être copolymérisé en solution aqueuse, en présence de N-N' méthylènebisacrylamide ("Bis") donnant naissance à un polymère qui s'insolubilise sous la forme d'un gel.



Après copolymérisation, le gel se présente comme un tamis dont on peut apprécier la dimension des pores en fonction des concentrations respectives en "Bis" et en Acrylamide, ref. DETERMAN (24).

Contrairement à la gélose, du fait de la neutralité électrique du polymère, il n'y a pas de courant d'électroendosmose, ni de phénomènes d'adsorption sauf peut-être pour les noyaux aromatiques. La transparence du gel est également une propriété très appréciable pour une exploitation densitométrique.

1.2.2. Influence de divers paramètres.

- Concentration du Gel en Acrylamide : Il existe une relation linéaire entre le logarithme de la mobilité électrophorétique et la teneur du gel en polyacrylamide qui montre que la mobilité décroît à mesure que la concentration augmente c'est à dire que la taille des pores du gel diminue ; il s'agit donc d'un véritable tamisage moléculaire.

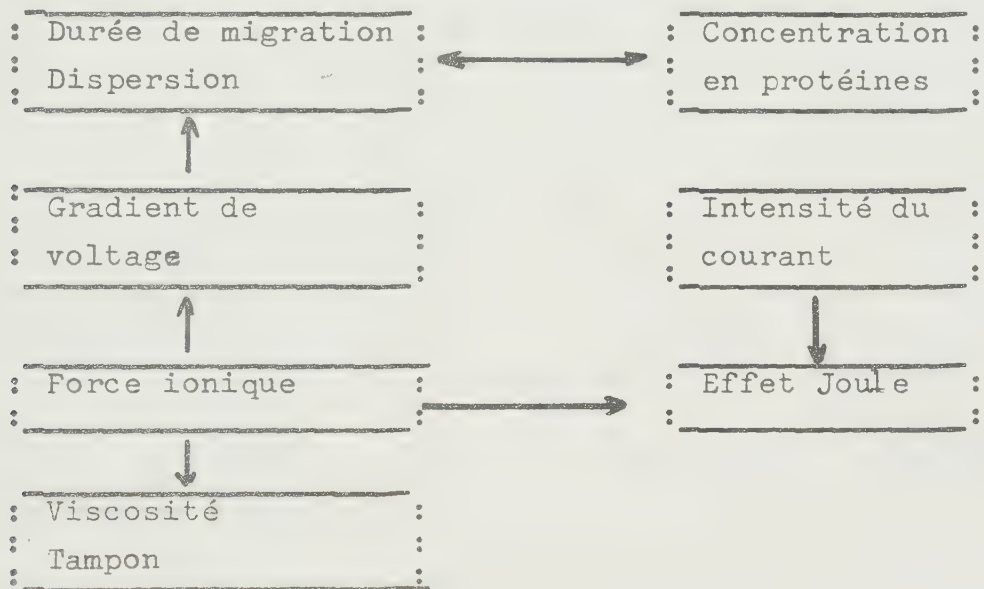
- Intensité du courant : Schématiquement on peut dire que la dispersion est d'autant plus importante pour une valeur donnée de la concentration, que l'intensité du courant passant dans chaque tube est plus forte. C'est ainsi qu'avec un ampérage trop fort, on obtient des disques flous.

- Quantité de protéines : Si l'on atteint une concentration minimale, la dispersion des fractions augmente avec la quantité de protéines, alors qu'aux concentrations habituelles d'utilisation, aucun effet notoire n'est remarqué.

- Force ionique : C'est un paramètre sous la dépendance directe du voltage et de la molarité des tampons. Il faudrait s'attacher à obtenir une force ionique minimale pour avoir une mobilité optimale des particules. Cependant une trop forte diminution de la force ionique aura deux effets indirects :

- Raccourcir le temps de migration
- diminuer la viscosité du tampon.

Avec LUNNEY et coll. (66) on peut résumer sous la forme d'un tableau ces considérations qui montrent l'interdépendance de certains paramètres. (Voir tableau ci-dessous).



- Tampons : Il faut distinguer trois cas .

1er cas : le même tampon se trouve dans le gel et les bacs à électrode, c'est un système continu.

2èm cas : présence dans le gel d'un tampon différent de celui des bacs à électrodes, c'est un système discontinu.

3èm cas : système discontinu à trois tampons différents, c'est la technique du "Disc électrophoresis" que nous allons examiner d'une façon plus détaillée.

1.2.3. "Disc Electrophoresis"

Cette technique fut décrite pour la première fois en 1964 par ORNSTEIN et DAVIS dans les Annales de l'Académie des Sciences de New-York (81).

C'est un procédé original qui fait intervenir trois systèmes tampons : un dans les bacs à électrode et deux dans le support électrophorétique, lui-même constitué de trois gels différents.

Dans un tube de verre de diamètre voisin de 0,5 cm et d'une hauteur de 10 cm sont polymérisés successivement et les uns au dessus des autres trois gels différents par leur concentration en acrylamide et par leur pH. Dans l'ordre le gel échantillon, le gel de rassemblement et le gel de séparation. Le schéma du système et de ses constituants est représenté page 33 . L'ensemble est donc formé de trois gels, le gel supérieur contiendra dispersé dans ses mailles, l'échantillon protéique.

Schématiquement on peut considérer par rapport aux protéines que le système fonctionne en deux temps. Un premier, aboutissant grâce au gel intermédiaire à un rassemblement dans l'espace des protéines à un tel degré qu'elles occupent à l'entrée du gel inférieur un disque de 25 microns seulement d'épaisseur, un deuxième temps conduit à une séparation sur plusieurs centimètres de ces protéines qui vont prendre le départ au début du "Small pore gel" d'ORNSTEIN et DAVIS (81).

Après avoir explicité d'une façon schématique le fonctionnement du système nous allons reprendre l'étude plus détaillée du mécanisme :

1er temps, concentration : dans cette technique nous avons un ~~conducteur vertical liquide~~ où sont superposés deux ions de mobilité différente (un ion lent, un ion rapide). L'ion glycocolle, le plus lent, au pH 8,3 sera représenté par le symbole GLY^- , Ces ions se trouvent dans la cuve supérieure. L'ion chlorure au pH 8,3 sera représenté par le symbole Cl^- , ces ions sont dans le gel. On a donc formation d'une barrière qui se déplace en direction de l'anode proportionnellement à l'intensité. Autrement dit, il existe dans tout le tube une zone de mobilité ionique faible (cas de Gly^-) qui devra aller de pair avec l'existence d'un gradient de potentiel plus important. Ainsi la différence de potentiel au-dessus de la barrière est supérieure à celle qui existe au dessous.

La plupart des protéines ont des mobilités situées de part et d'autre de celle des ions Gly^- et Cl^- qui ont été justement choisis pour cette raison. Donc si on dépose des protéines à pH 8,3, elles vont migrer vers l'anode relativement vite puisqu'on se trouve dans la zone de haut gradient de potentiel. Si elles dépassent la frontière Gly^-/Cl^- elles se trouvent alors en "zone Cl^- " de faible gradient de voltage et

	NOM	COMPOSITION	pH	POROSITE
	TAMPON	GLYCOCOLLE/ TRIS	8,3	LIQUIDE
	GEL ECHANTILLON	ACRYLAMIDE 1,25 % (dont Bis = 25 %). + Tampon TRIS/ Hcl	6,7 6,7	GEL A MAILLIES TRES LARGES.
	GEL DE RASSEMBLE- MENT	ACRYLAMIDE 2,5 % (dont Bis = 25 %). + Tampon TRIS/ Hcl	6,7 6,7	GEL A MAILLIES LARGES
	GEL DE SEPARATION	ACRYLAMIDE 7 % (dont Bis = 2 %). + Tampon TRIS/ Hcl	8,9 8,9	GEL A POROSITE FAIBLE
	TAMPON	GLYCOCOLLE/ TRIS	8,3	LIQUIDE

CHLORURES Cl^-

IONS GLYCOCOLLE Gly^-

PROTEINES



sont donc freinées aussitôt, la frontière les rattrapant.

De cette façon, on obtient une concentration très élégante des protéines, d'autant plus qu'elles viennent butter contre le gel de séparation aux mailles beaucoup plus fines. Notons que dans les deux premiers gels d'échantillon et de rassemblement tout assure cette concentration : en effet les gels ont des pores très larges ce qui évite un arrêt des trop grosses molécules, de plus les gels sont dans un tampon pH 6,7 ce qui entraîne peu de séparation en fonction des charges.

2ème temps, séparation : Les protéines abordent le troisième gel en étant toutes rassemblées sous la forme d'un disque. A ce moment là, les conditions changent totalement : les mailles plus fines du gel de séparation freinent les protéines en fonction du diamètre moléculaire, le pH 8,9 du tampon plus alcalin fait apparaître les différences de mobilité entre les protéines. A partir de ce niveau, on se trouve désormais en gradient linéaire de voltage, l'électrophorèse proprement dite peut commencer, l'étape de concentration est pleinement réalisée.

1.3. Méthodes et Techniques

1.3.1. Etape préliminaire

Dans un premier temps nous sommes amenés à une détermination du taux de protéines de l'échantillon à analyser de façon à connaître le volume de liquide à utiliser, car nous effectuons une pose toujours constante de 180 microgrammes de protéines.

Nous utilisons une technique automatisée, employée quotidiennement à l'Hôpital Neurologique pour déterminer la protéinorachie ; elle dérive de la technique de MEULEMANS (1960) (77) fondée sur la mesure turbidimétrique du trouble produit par la précipitation trichloracétique à 3,6 % des protéines du L.C.R. Cette méthode nous donne entière satisfaction, son seul inconvénient est de nécessiter une dilution préalable pour les liquides dont le taux de protéines dépasse 1g/l.

Avec une telle méthode, les variations physiologiques de la protéinorachie se situent pour le liquide spinal de 0,20 g à 0,40 g/l. ; chiffres qui paraissent peut-être élevés en regard des taux plus bas donnés par d'autres techniques, ceci est sans doute lié en partie au fait que la précipitation trichloracétique est plus complète qu'avec d'autres acides comme l'acide sulfosalicylique.

1.3.2. Réactifs

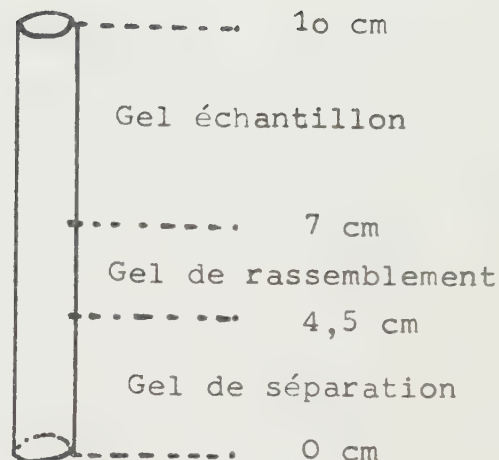
(Tris, Teimed, Acrylamide, ref. Canalco)

(Sacchorose, Persulfate NH_4 , Glycine, ref. Prolabo)

<u>Solution A</u> : 8,8 pH 9,0	Tris..... 36,3 g Teimed..... 0,23 ml. HcL N q.s.p..... pH H_2O q.s.p..... 100 ml.
<u>Solution B</u> : 6,6 pH 6,8	Tris..... 5,98 g Teimed..... 0,46 ml HCL N q.s.p..... pH H_2O q.s.p..... 100 ml.
<u>Solution C</u> :	Acrylamide..... 28,0 g Bis..... 0,735 g HIO q.s.p..... 100 ml
<u>Solution D</u> :	Acrylamide..... 10 g Bis..... 2,5 g H_2O q.s.p..... 100 ml.
<u>Solution E</u> :	Riboflavine..... 4,0 mg H_2O 100 ml.
<u>Solution F</u> :	Sacchorose..... 40 g. H_2O q.s.p..... 100 ml.
<u>Solution G</u> :	Persulfate d' NH_4 .. 0,14 g H_2O q.s.p..... 100 ml.
<u>Solution H</u> :	Tris..... 3 g Glycine..... 14,4 g H_2O q.s.p..... 1000 ml.
<u>Solution J</u> :	"Tracking dye : Bleu de Bromophénol aqueuse à 0,005 g/100 ml.
<u>Colorant</u>	Noir amide..... 1 g Acide acétique 7 % 200 ml.
<u>Solution de lavage</u> :	Sol.B (pH 6,7);... 1,5 ml Sol.E (Riboflavine) 1,5 ml Eau distillée..... 8 ml.

1.3.3. Mode Opératoire

Pour la formation du gel on emploie comme moule des tubes de verre fermés à une extrémité par un bouchon de "parafilm", et placés verticalement sur un portoir, la partie fermée tournée vers le bas.



1.3.3.1. Préparation des solutions

Gel de séparation : (pour 6 tubes) Gel à 7 %

Dans un tube à essai :

-Sol. A (tampon pH 8,9)	1 ml
-Sol. C (Acrylamide 28 %)	2 ml
-Sol. G (Catalyseur).....	4 ml
-Eau distillée.....	1 ml

Introduire la solution ainsi préparée dans les tubes avec une pipette pasteur jusqu'au premier trait (4,5cm.)
Secouer le tube pour chasser les bulles d'air du fond.

Introduire quelques gouttes d'eau pour obtenir une surface de séparation nette avec le gel suivant .
Laisser polymériser pendant 10 minutes.

Gel de rassemblement : (pour 6 tubes) Gel à 2,5 %

- Mettre dans un tube :

- Sol. B (pH 6,7).....	1 ml
- Sol. D (Acrylamide 10 %)	1 ml
- Sol. E (Catalyseur)	0,5 ml
- Sol. F (Saccharose)	2 ml

- Boucher et mettre à l'abri de la lumière pour éviter la polymérisation du mélange.

Gel échantillon : (pour 6 tubes) Gel à 1,25 %

- Placer dans un tube :

- Sol. B (pH 6,7)	1 ml
- Sol. D (Acrylamide 10%)	2 ml
- Sol. E (Catalyseur)	1 ml

- Boucher et mettre également à l'abri de la lumière.

1.3.3.2. Préparation de l'échantillon

Dans des tubes à hémolyse introduire un peu de saccharose en poudre de façon à recouvrir le fond du tube. Mettre la quantité de L.C.R. nécessaire pour avoir 180 microgrammes de protéines.

Compléter à 0,6 ml avec de l'eau distillée. Mélanger. Ajouter 0,4 ml de la solution

"gel échantillon".

Mélanger à nouveau.

1.3.3.3. Pose de l'échantillon

Le gel de séparation étant pris, ajouter la solution de lavage dans les tubes, puis les vider par retournement.

Sécher la surface de séparation du gel avec une bande de papier filtre.

Ensuite introduire la solution "gel de rassemblement" jusqu'au deuxième trait (7cm). Mettre quelques gouttes d'eau pour permettre une surface de séparation nette, et placer 10 minutes à la lumière du jour pour polymérisation (par temps sombre mettre sous lampe U.V.)

Sécher le deuxième gel d'une manière identique au premier et introduire tout le contenu du tube à hémolyse au-dessus de gel de rassemblement polymérisé.

Placer à la lumière du jour pendant une demi heure.

1.3.3.4. Migration électrophorétique

Le montage utilisé est réalisé par l'emboîtement de deux cuves disposées l'une sur l'autre : une cuve supérieure dont le couvercle supporte la cathode est perforée de 12 trous où l'on fixe les tubes au moyen de bouchons dont la partie centrale est évidée, une cuve inférieure où est fixée sur la partie basse, une anode de platine et qui dispose d'un système réfrigérant à l'intérieur. (cf. Photo N° 1).

Mettre le même tampon tris-glycocolle pH 8,3 dans les deux compartiments.

Ajouter dans la cuve supérieure du "Tracking dye" (bleu de bromophénol).

Les tubes sont enfoncés dans la cuve du haut jusqu'au premier trait.

Fermer la cuve supérieure par un couvercle et mettre sous tension avec un ampérage de 60 mA. Augmenter l'intensité progressivement pour obtenir 400 v.

Laisser migrer 1 H30. (C'est à dire jusqu'à ce que le front de migration soit à 7 mm du bord inférieur du gel).

Enlever les tubes et détacher le gel de séparation en injectant de l'eau distillée à l'aide d'une seringue, entre le gel et la paroi du tube.

1.3.3.5. Coloration

Au préalable couper les gels en deux dans le sens longitudinal.

Colorer une moitié du gel par immersion dans le noir amide pendant 1 heure.

Conservier l'autre moitié qui servira à une étude par immuno-diffusion comme nous le verrons un peu plus loin.

1.3.3.6. Décoloration

C'est le temps le plus long de la technique classique ; par bains successifs la décoloration nécessite au moins trois jours. On l'accélère un peu en mettant les gels dans des corps de seringues plongés dans une éprouvette contenant de l'acide acétique à 7 % que l'on renouvelle fréquemment. Mais c'est par électrophorèse, après quelques mises au point, que nous avons pu obtenir la décoloration la plus rapide sans aucune déformation des disques protéiques. Il s'agit en fait d'une électrophorèse en milieu acétique réalisée perpendiculairement au grand axe de migration des protéines.

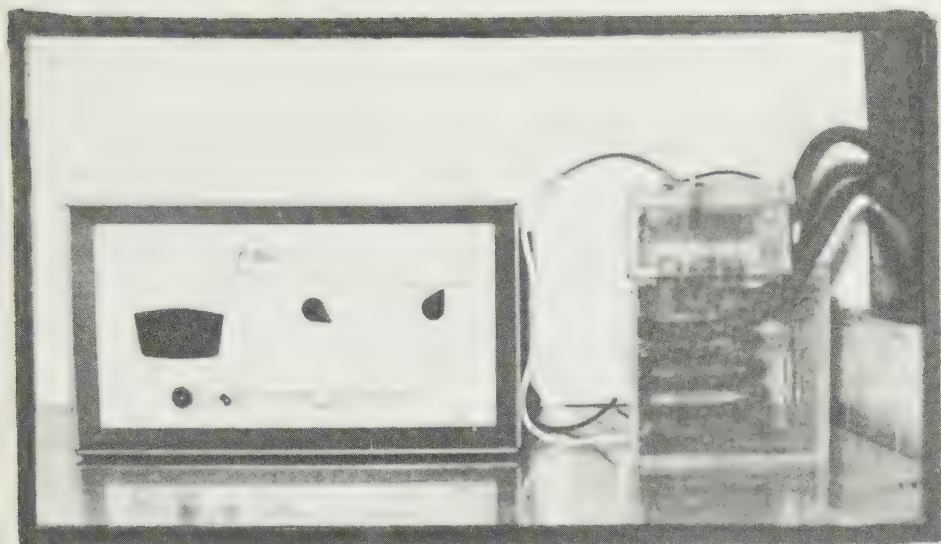
Nous utilisons dans ce but un dispositif original fourni par la Société "Canalco" dont nous donnons la reproduction du montage en fonctionnement (photo N° 2). Par ce procédé, on réalise facilement une décoloration en une heure ou deux. La mesure densitométrique a été réalisée sur les 1/2 gels à l'aide d'un appareil disposant d'un intégrateur automatique type "Chromoscan".

1.3.4. Discussions

A l'inverse des autres supports, le gel de polyacrylamide permet une séparation des protéines dans un temps très court. (le gel de séparation est parcouru en une demi-heure environ par le colorant de front placé à la frontière $\text{Gly}^- - \text{Cl}^-$).

Plus encore que le gel d'amidon, il permet de différencier des molécules de même mobilité mais de poids moléculaire différent (tamisage moléculaire).

La combinaison des 2 facteurs, tamisage moléculaire et apolarité du support, confère à cette technique un très haut pouvoir de résolution. En outre, la technique d'ORNSTEIN et DAVIS permet de concentrer un ml de solution pauvre en protéines comme le LC.R. sous la forme d'un disque de quelques dizaines de microns d'épaisseur.



Montage Electrophorétique

En

Gel de Polyacrylamide

①

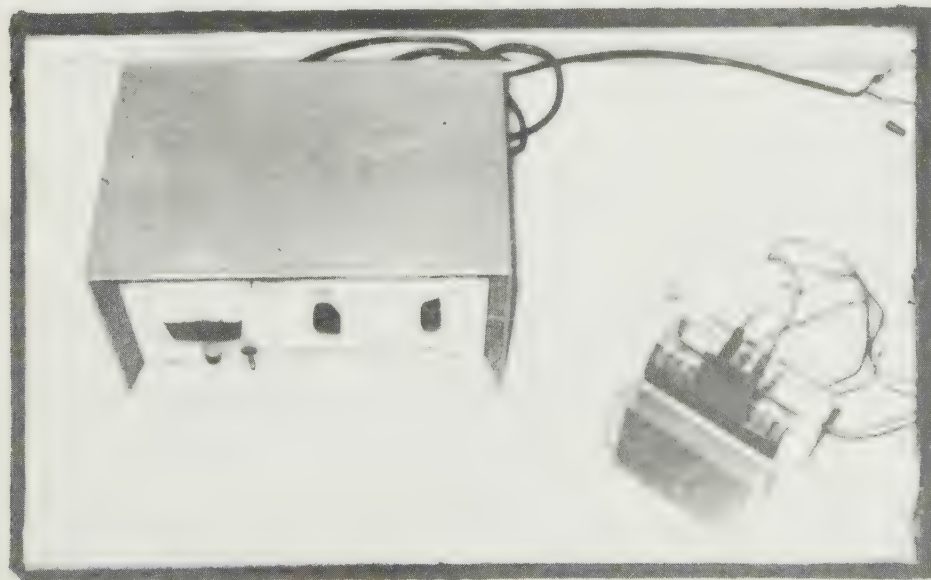


Gels

Après

Décoloration

②



Décoloration

par

Electrophorèse

On évite ainsi tout phénomène d'altération pouvant se produire par d'autres procédés de concentration.

Nous avons également noté l'absence de flux d'électroendosmose que l'on peut néanmoins introduire, si nécessaire par addition d'acide acrylique dans le gel, permettant ainsi une meilleure séparation des gamma-globulines. De plus, la transparence du gel se trouve très adaptée à un traitement densitométrique.

Toutefois, il existe quelques limites dans l'utilisation de cette technique : en premier lieu, comme pour d'autres supports, nous pensons que l'évaluation en pourcentage relatif de chaque fraction doit toujours être considérée comme une approximation, plus ou moins satisfaisante de celle-ci et non comme une estimation absolue pouvant être chiffrée en mg/l de protéines par exemple. Ce problème est plus particulièrement ressenti dans l'évaluation de l'albumine, phénomène que nous avons souligné au cours de notre premier chapitre. Parfois l'assymétrie des demi-gels due à un découpage irrégulier, peut créer une reproductibilité médiocre dans l'évaluation densitométrique.

Enfin, pour terminer cette étude critique, on peut également reprocher aux réactifs utilisés une certaine toxicité. Encore que, quelques griefs à notre avis minimes puissent être faits à cette technique, elle nous est apparue comme la solution actuellement la plus élégante au problème que pose l'étude électrophorétique d'un liquide pauvre en protéines.

1.4. Résultats (Polyacrylamide)

Avec la technique précédemment décrite, nous avons pu séparer un certain nombre de fractions dans le L.C.R. "normal" (conf. Photo N° 3). Nous avons considéré comme normaux les liquides clairs, comportant moins d'un élément par mm³, dont la protéinorachie ne dépassait pas 0,40 g/l par la méthode de MEULEMANS (77). Les chlores et le glucose étant par ailleurs normaux. Nous avons déterminé notre propre terminologie pour l'appellation de certaines de ces fractions. De l'anode à la cathode, nous avons pu séparer : une fraction préalbuminique l'albumine, 5 fractions post-albuminiques que nous avons dénommées prétransferrines, dans l'ordre 5,4,3,2,1, 2 fractions dans la zone Béta globulines, 1 à 2 fractions dans la zone post Béta globulines, 1 à 3 fractions dans la zone gamma Globulines, enfin à l'entrée du gel dans une zone dite "macroglobuline" nous avons retrouvé d'une façon constante la présence d'une fraction. Nous préciserons l'identifié de ces différentes fractions au paragraphe 2 consacré à ce problème.

Du point de vue quantitatif un pourcentage moyen et relatif de ces fractions à été établi comme suit :

- Pré-albumine.....	8 - 10 %
- Albumine.....	45 - 50 %
- Prétransferrine 4 et 5.....	2 - 5 %
- Prétransferrine 3 et 2.....	3,5 - 6,5 %
- Transferrine I, Haptoglobine.....	14 - 18 %
- Transferrine 2.....	7 - 9 %
- Gamma Globulines.....	8 - 10 %

(Chromoscan de "JOYCE-LOEBL")

Nous sommes très conscients qu'avec notre système d'enregistrement écrétant le pic d'albumine, nos pourcentages sont nettement sous estimés pour cette fraction.

Ce problème est néanmoins peu gênant pour l'établissement de nos profils protéiques, et l'étude comparative que nous en ferons. Car nous estimons avec d'autres auteurs que si l'électrophorèse est une méthode satisfaisante pour fournir une approximation des différentes fractions séparées, en aucun cas elle n'autorise à donner un chiffre de protéines exprimé en grammes/litre.

2. IDENTIFICATION DES FRACTIONS "SÉRIQUES"

Sous la dénomination fractions sériques, nous avons désigné les protéines révélées par des sérums anti S.H.N.

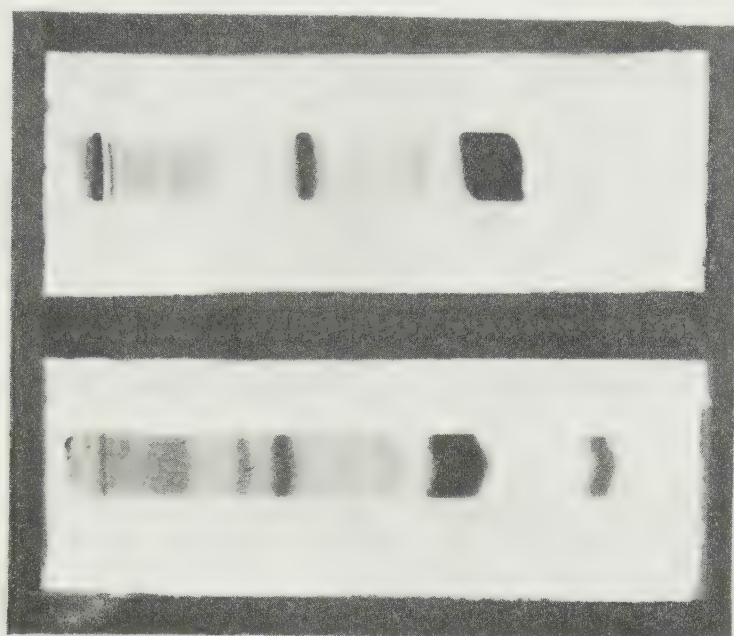
2.1. Méthode Immuno-diffusion

2.1.1. Techniques sur gel entier

Comme nous l'avons décrit, précédemment après électrophorèse des protéines du L.C.R. nous obtenons un gel cylindrique qui est découpé aussitôt dans son sens longitudinal en deux parties égales. Une partie est colorée, l'autre nous sert à réaliser une immuno-diffusion contre un anti S.H.N. polyvalent (conf. Photo N° 4), l'électro-diffusion ne nous ayant jamais donné de résultats très satisfaisants.

Dans ce but on dispose sur le bord d'une lame de verre (25x75) le gel héli-cylindrique sur sa face plane. On coule ensuite autour du gel 3 ml de gélose à 1 % en tampon pH 7 à une température convenable de façon à ne pas dénaturer les protéines contenues dans le gel. L'ensemble est abandonné 1/2 heure en chambre humide à + 4°C. Ce laps de temps écoulé, on réalise sur l'autre bord de la lame, parallèlement au gel à 1 cm, une gouttière de 2mm/60 mm à l'aide d'un emporte pièce, où l'on disposera l'immun-sérum.

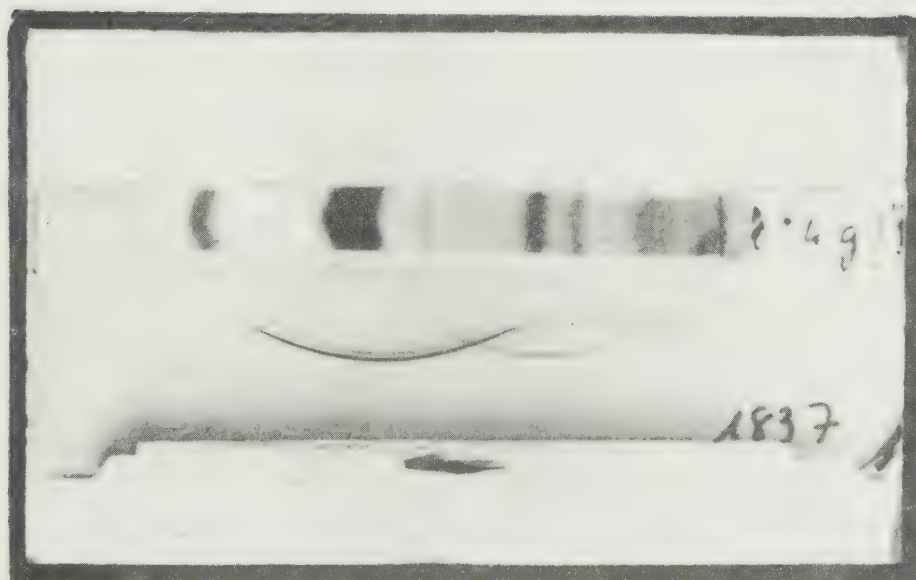
Spectre électrophorétique en gel de polyacrylamide



SÉRUM

L.C.R.

③



I.E.P d'un L.C.R. normal avec anti S.H.N.

④

La diffusion proprement dite s'effectue en chambre humide à la température du laboratoire pendant 3 jours. Ensuite le gel est retiré de la gélose qui est immergée dans un premier bain de Na Cl de 3 heures, puis un second de 24 heures. Après ces opérations, la gélose est rincée dans un bain d'eau distillée pendant 1 heure, puis mise à sécher sous une hotte ventilée sous une épaisseur de papier filtre. La coloration est effectuée par immersion d'une minute dans le noir amide ; la décoloration est réalisée à son tour par 3 passages successifs dans des solutions d'acide acétique 3 %.

2.1.2. Technique sur gel découpé transversalement

Nous utilisons ici une technique donnée par CHRAMBACH et coll. en 1967 (Ref. 12) qui nous permet de fixer rapidement les protéines séparées après électrophorèse. Une moitié de gel est mise à colorer immédiatement dans une solution de Bleu de Coumassie pendant 10 minutes pour éviter toute diffusion des protéines. Après cette fixation et cette coloration rapide les deux demisgels sont rassemblés côte à côte et l'on débite le gel vierge selon un repérage minutieux des fractions séparées sur l'autre gel. On obtient de cette façon une série de demisdisques correspondant tous à une zone précise de la migration électrophorétique.

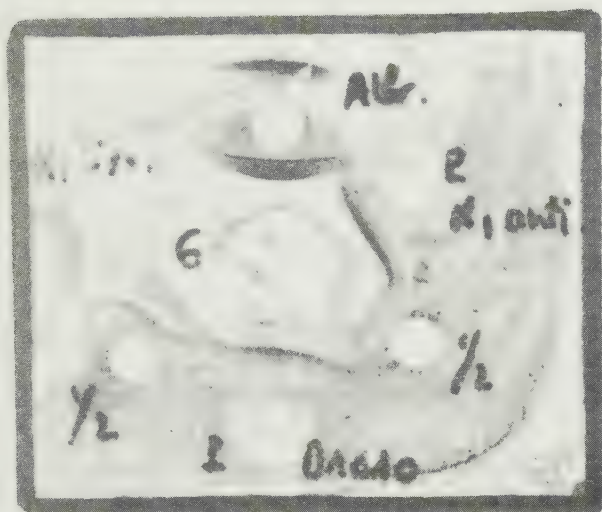
Ces demi disques sont ensuite déposés par leur face plane sur une plaque de verre. On coule autour de ces disques la même gélose que celle précédemment décrite. Après refroidissement de la gélose, des immun-sérums mono-spécifiques à différentes dilutions sont disposés tout autour des disques dans des puits découpés à l'emporte pièce.

La diffusion est réalisée en chambre humide pendant un temps minimum de 24 heures. Ensuite les disques sont retirés de la gélose. Les opérations suivantes s'effectuent selon un mode opératoire identique à celui décrit pour le gel entier.

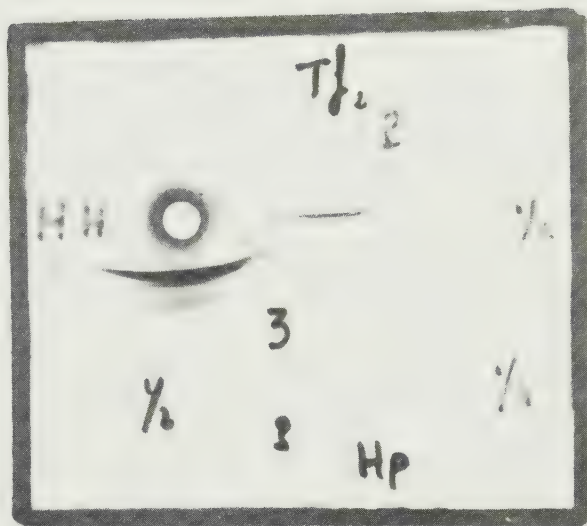
2.2. Résultats

L'image obtenue après diffusion d'un anti S.H.N contre les protéines du L.C.R. séparées sur héli-gel de polyacrylamide nous montre 8 lignes de précipitation (conf. Photo N° 4).

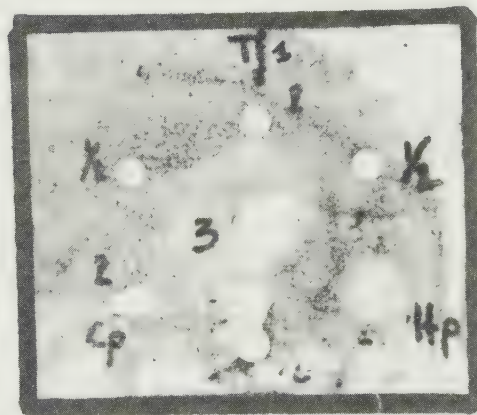
Par comparaison de ces arcs avec les différentes fractions séparées sur le gel et par analogie avec l'I.E.P. d'un sérum nous avons pu déterminer de façon assez précise de l'anode vers la cathode : une première ligne correspondant à la préalbumine, une deuxième constituée par l'albumine, à l'intérieur de celle-ci se trouve une 3ème ligne identifiée à l'Alpha I antitrypsine. Parfois on peut distinguer toujours à ce niveau une 4ème ligne coupant l'albumine dans sa fraction anodique et qui correspond à l'Orosomucoïde Alpha I.



(5)



(9)



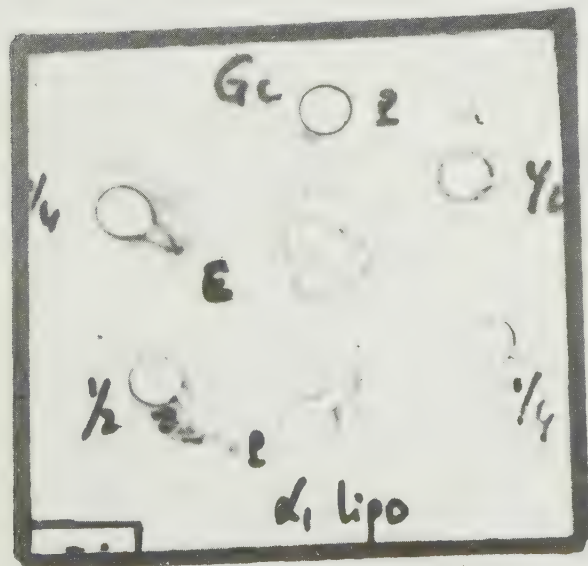
(7)

Albamine
 α_1 Globomucide
 α_1 anti hyposine

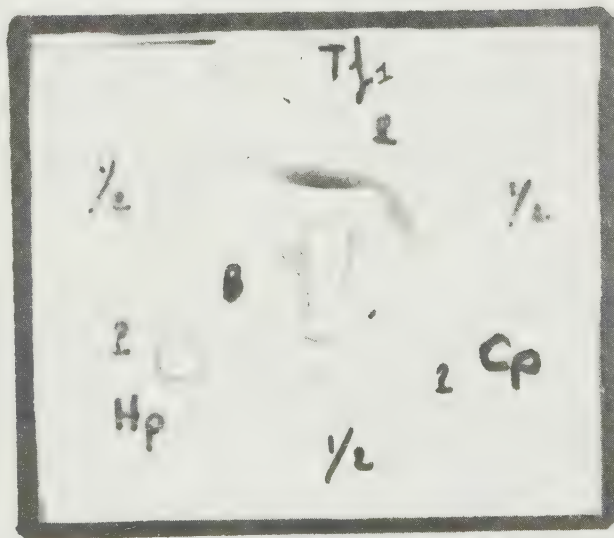
Gc
 α_1 lipo

Hp

Tf_1 Ch



(6)



(8)

La mise en évidence de cette fraction nous a paru souvent liée à une question de qualité des lots de nos anti-S.H.N., certains probablement de titre plus élevé que d'autres permettent sa visualisation. Ensuite jusqu'à la cathode seule la transferrine et les Gamma globulines nous ont paru pouvoir être identifiées avec certitude.

Avec la seconde technique, nous avons pu explorer le gel dans toutes ses fractions avec une précision et une certitude beaucoup plus grande.

C'est ainsi que nous avons pu repérer sous la fraction albumine, l'orosomucoïde Alpha I et l'Alpha I anti trypsine (conf. Photo N° 5)

Les pré-transferrines 5 et 4 ont été identifiées à la fraction Gc (Group component) (conf. Photo N° 6)

L'Alpha I lipoprotéine a été également retrouvée à des positions variables allant de l'albumine à l'Haptaglobine. (conf. Photo N° 6)

Les pré-transferrine 3 et 2 ont échappé à notre identification. En effet elles n'ont donné aucune ligne de précipitation avec les anti-sérums monospécifiques de l'hémopexine, de l'Alpha 2 H.S. ou de la céruloplasmine, fractions que nous comptons trouver à cet endroit. Néanmoins il s'agit vraisemblablement de fractions sériques, car les disques 3 et 2 nous ont toujours donné un arc de précipitation important avec un anti-S.H.N. et jamais avec notre anti-L.C.R. absorbé.

Au niveau de la zone Béta, nous avons localisé l'haptaglobine, la transferrine et la céruloplasmine (conf. Photo N° 7-8)

Au niveau de la fraction "Tau" nous avons bien reconnu la "deuxième" transferrine (Tf2) (conf. Photo N° 9).

Dans la région post Tf2 jusqu'à la région gamma nous avons obtenu un arc de précipitation avec un sérum anti-Béta I AC. Les positions variables de cette fraction s'expliquent sans doute par le fait que nous avons du révéler à chaque fois une fraction différente du complément (conf. Photo N° 10)

Dans la zone Gamma, nous avons localisé dans la partie la plus anodique l'IgA (conf. Photo N° 11) dans la partie cathodique, les polymères de l'haptaglobine et les IgG. (conf. Photo N° 11-12)

Enfin à l'entrée du gel a été reconnue l'Alpha 2 M macroglobuline.

2.3. Discussion

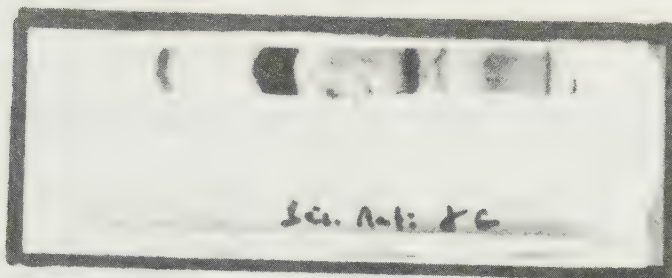
A notre avis si la technique d'immuno-diffusion sur gel entier contre un anti-S.H.N. nous a paru intéressante pour l'obtention d'une image immuno-électrophorétique globale des protéines séparées, par contre elle n'a jamais pu nous permettre d'identifier avec certitude certaines fractions très bien repérées sur le gel.

Cela tient en partie au fait que certaines protéines se trouvent emprisonnées dans les mailles du gel de telle sorte que leur diffusion dans le film de gélose est extrêmement ralentie

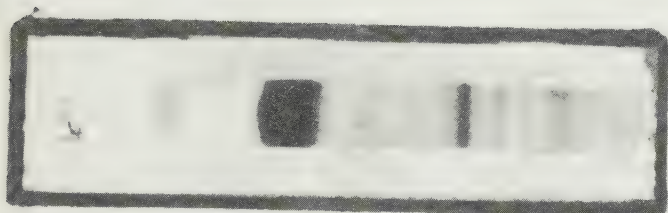
ou même impossible, ou que les anti-sérums utilisés, équilibrés pour les fractions d'un sérum, ne l'étaient plus pour les quantités présentes dans le L.C.R.

En contre partie la diffusion à partir des disques de polyacrylamide nous a donné entière satisfaction quant à l'identification précise des fractions séparées.

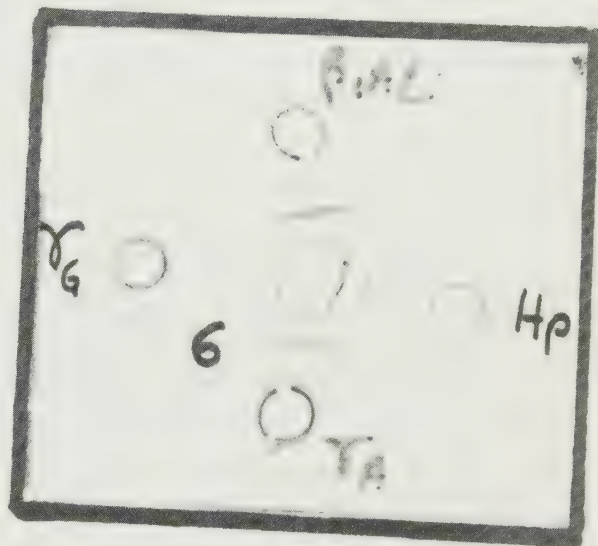
Cette technique nous a donc été extrêmement utile dans un premier temps pour l'identification première, mais dans une exploration systématique de routine seule la diffusion sur gel entier a pu être retenue du fait de sa réalisation plus aisée.



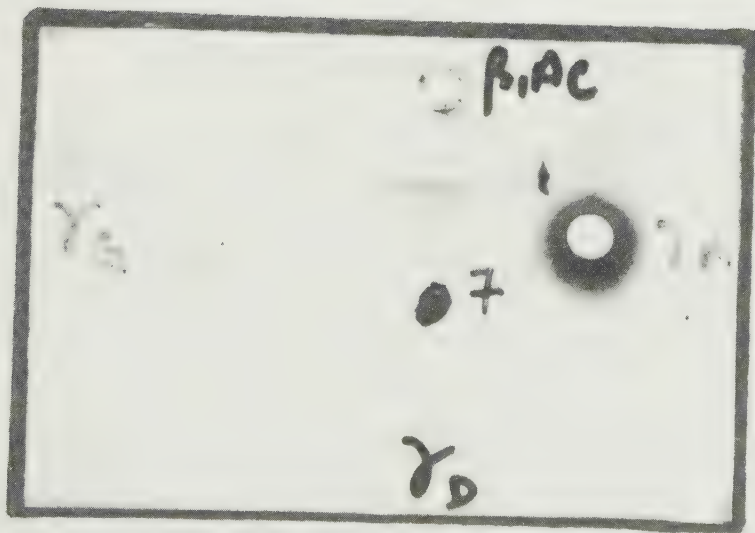
12



B,Ac
IgG
B,Ac IgG



11



10

3. Essai d'identification de certaines fractions "tissulaires"

3.1. Définition du problème

Nous appellerons fraction "tissulaire" les protéines révélées par un sérum anti L.C.R. absorbé sur S.H.N. Comme nous l'avons rappelé précédemment, ces protéines doivent provenir des tissus cérébraux ou adjacents au L.C.R. Dans certains cas pathologiques, ces fractions semblent prendre une part importante à l'élaboration du profil protéique, aussi avons nous essayé de repérer dans le cadre de la technique sur polyacrylamide, la position de ces "fractions traces" sur le gel dans le L.C.R. normal. Dans ce but nous avons préparé un sérum anti-L.C.R.

3.2 Préparation du sérum anti LC.R.

Nous avons utilisé pour ce travail un pool de L.C.R. constitué à partir de prélèvements réalisés chez des sujets à l'occasion d'une pneumo encéphalographie gazeuse. Le dosage des protéines effectué sur pool par la technique de MEULEMANS nous a donné un chiffre de 0,46 g/l.

Ce L.C.R. a été ensuite dialysé contre un tampon phosphate concentré approximativement au I/4 à l'intérieur de boyaux de cellophane (ref.Viking 32/32 Block) contre une solution de polyéthylène glycol. Après concentration, il fut congelé sous un volume de 1 ml. puis lyophilisé à l'intérieur de petits flacons, chaque récipient contenant environ 2 mg de protéines. Pour des questions de commodité, l'animal choisi pour l'immunisation fut le lapin.

3.2.1. Protocole de l'immunisation

Trois lapins ont été immunisés. La quantité de protéines injectées fut de 2 mg/dose pour les 4 premières injections, puis de 4 mg/dose pour les injections de rappel.

L'immunisation a été réalisée par voie I.M. la solution injectée au lapin se prépare comme suit :

I flacon lyophilisé de 2 mg de protéines
plus I ml d'eau distillée
plus I ml d'adjuvant complet de FREUND

4 injections de cette suspension furent pratiquées tous les 15 jours. L'injection est pratiquée en 3 points dans les pattes arrières du lapin. A partir de la 3ème injection, 2 ml de sang sont prélevés dans la veine marginale de l'oreille de l'animal pour pratiquer les essais jugeant de la valeur de l'immunisation.

Cette immunisation n'étant pas suffisante nous avons ensuite pratiqué une série de 4 injections espacées de 8 jours avec 4 mg de protéines/dose. Les animaux sont laissés une semaine au repos, puis saignés au niveau de la veine marginale de l'oreille, grâce à un dispositif original aimablement conseillé par le Dr PAUTRIZEL chef du service d'Immunologie des maladies parasitaires à l'I.N.S.E.R.M. de Bordeaux. En effet lors des divers prises de sang effectuées sur la veine marginale de l'animal souvent nous obtenions et parfois dans des conditions difficiles un sérum hémolysé. Aussi pour pallier cet inconvénient, nous avons utilisé un dispositif ingénieux permettant après incision de la veine de faire couler le sang très facilement. Il consiste à créer une dépression au niveau de l'oreille, introduire dans un récipient relié lui-même à une trompe à vide. Avec ce procédé, si l'incision est importante et le temps d'aspiration suffisant, on réalise sans ennui une saignée presque totale de l'animal. Un schéma de l'immunisation est présenté sur le tableau page 46.

3.2.2. Contrôle des réponses immunitaires

A cet effet nous avons utilisé 3 Méthodes.

3.2.2.1. Méthode de double diffusion

Sans vouloir rappeler la technique en deux dimensions d'OUCHTERLONY (82), nous dirons cependant qu'elle a été réalisée sur plaques d'agar Noble à 1,5 % dans un tampon phosphate pH 7. La diffusion en chambre humide à température du laboratoire a été de 48 heures.

3.2.2.2. I.E.P. modifiée selon SHEIDEGGER

Nous avons déjà décrit cette technique au chapitre I, 3.2.

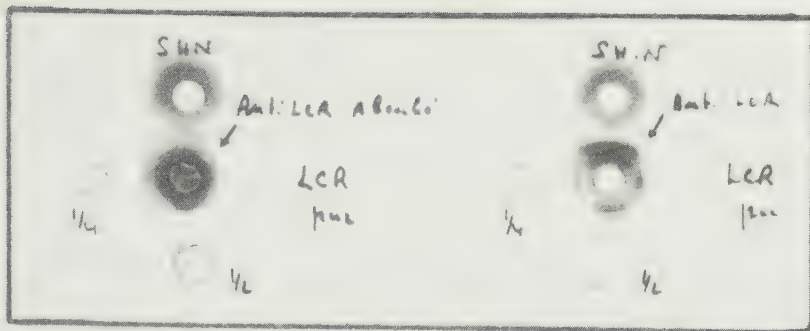
Elle nous a permis avec un sérum de chèvre anti-protéine de lapin, de constater une intense ligne de précipitation au niveau des IgG, reflet d'une bonne réponse immunitaire des animaux. (conf. Photo N° I4). Quel que soit le type de contrôle, nous avons toujours effectué parallèlement une I.E.P. d'un S.H.N. contre notre anti L.C.R.

3.2.2.3. Absorption des anti-sérums

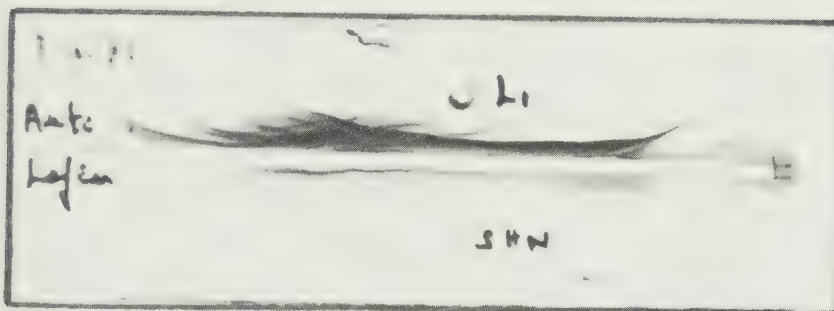
Ce procédé a été réalisé dans le cadre des deux méthodes que nous venons de citer.

En immuno-diffusion nous procédons comme suit : on réalise sur une plaque de gélose 4 puits orientés sur un puits central que l'on remplit avec un pool de S.H.N., on laisse ainsi diffuser 1 heure en chambre humide. Après ce délai l'excès de liquide du puits central est éliminé par capillarité sur un papier filtre.

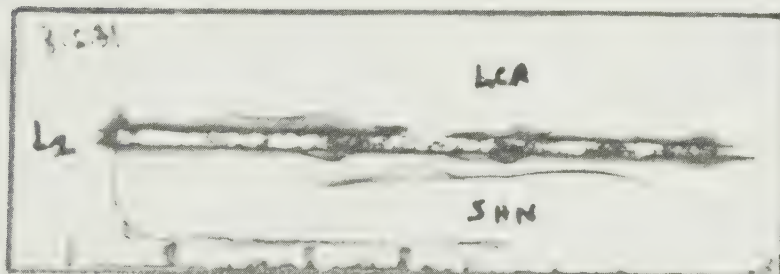
: TEMPS en JOURS :	INJECTIONS :	PRISES DE SANG :
: (J) :	:	:
:	:	:
:	: 1ère injection en I.M. :	:
:	: en 3 points, de 2 mg de :	:
:	: protéines dissous dans :	:
: J 0 :	: 1 ml d'eau distillée :	: 0 :
:	: et 1 ml d'une solution :	:
:	: d'adjuvant de Freund :	:
:	: complet :	:
:	:	:
: J + 15 :	: 2ème Injection I.M. :	: 0 :
:	: idem :	:
:	:	:
: J + 30 :	: 3ème injection I.M. :	: 1ère :
:	: idem :	:
:	:	:
: J + 45 :	: 4ème injection I.M. :	:
:	: idem :	: 2ème :
:	:	:
: De J + 45 à J + 60 :	: REPOS DES :	:
:	: ANIMAUX :	:
:	:	:
: J + 60 :	: 5ème injection I.M. :	:
:	: idem mais avec 4 mg :	: 3ème :
:	: de protéines :	:
:	:	:
: J + 68 :	: 6ème injection I.M. :	:
:	: idem :	: 4ème :
:	:	:
: J + 76 :	: 7ème injection I.M. :	: 5ème :
:	: idem :	:
:	:	:
: J + 84 :	: 8ème injection I.M. :	: 6ème :
:	: idem :	:
:	:	:
: J + 90 :	:	: saignée complète :
:	:	: des animaux :



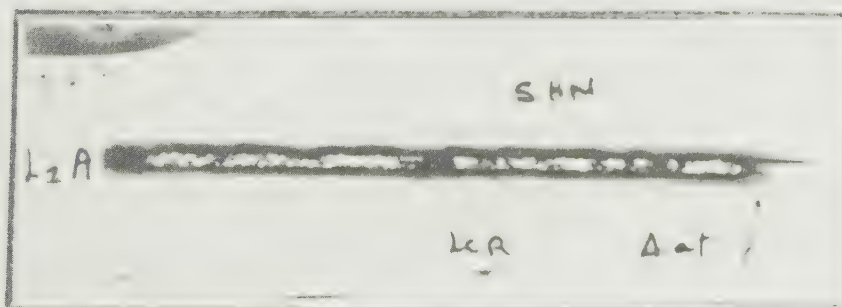
13



14



15



16

On dispose alors l'anti-L.C.R. à tester dans le puits central, 3 des puits périphériques reçoivent du LC.R. concentré (environ 20 g de protéines par litre), le quatrième puits, recevant du S.H.N., nous sert de contrôle. La diffusion en chambre humide s'effectue en 48 heures.

Dans le cadre de l'I.E.P., nous avons pratiqué les absorptions de nos anti-L.C.R. sur S.H.N. lyophilisé pendant 12 heures. La qualité même de l'absorption validant la manipulation, dans tous nos essais, nous avons vérifié l'absence d'arcs de précipitation de l'anti-LC.C.R. contre un pool de S.H.N.

3.2.3. Résultats

Deux lapins sur trois ont répondu d'une façon satisfaisante. Le contrôle des immunisations, par immuno-diffusion montre la présence après absorption de l'anti-L.C.R. sur S.H.N. d'un arc de précipitation (conf. Photo N° 13).

L'étude I.E.P. montre avec l'anti-L.C.R. absorbé une ligne de précipitation identifiée à la "Delta a T" de LATERRE, (conf. Photo N° 16) et une ligne de précipitation avec l'anti-L.C.R. non absorbé, ligne qui n'a pas son équivalent dans le S.H.N. étudié parallèlement (conf. Photo N° 15). Cette ligne de précipitation a été identifiée à la "Béta a T" de LATERRE, par sa position près de la gouttière de l'anti-sérum. Par contre, sa disparition après adsorption de l'anti-L.C.R. sur S.H.N. tient à notre avis probablement à un phénomène non spécifique, puisque cette ligne de précipitation n'a jamais été retrouvée dans le S.H.N.

En résumé, notre anti-L.C.R. ainsi préparé permet de mettre en évidence dans certaines conditions deux fractions "tissulaires" : la "Béta 2 a T" et la "Delta a T".

3.3. Méthodes d'identification

Deux techniques différentes ont été utilisées dans le but de repérer sur le gel de polyacrylamide la place occupée par différentes fractions tissulaires.

3.3.1. Méthodes des "inclusions"

Nous avons mis à profit le principe de la méthode décrite par ROBERT et coll. en 1966 (90). Elle consiste à inclure dans le gel de rassemblement des Ac anti S.H.N. Cette méthode ne prétend pas étudier la zone gamma puisque les IgG incluses dans le gel migrent aussi dans cette zone. Par contre elle permet une exploration assez complète du reste du gel.

En effet les protéines sériques au cours de leur migration dans le gel de rassemblement rencontrent les Ac. anti-S.H.N, puis vont être arrêtées dans leur migration, seules échappent à ce traitement les fractions tissulaires.

La réalisation technique en est assez simple. Après séparation des IgG du sérum anti-S.H.N. sur D.E.A.E. cellulose avec un tampon tris phosphate pH 8,6 par la méthode décrite par ELBERT et PETERSEN (27), les Ac ainsi obtenus sont inclus à différentes dilutions dans le gel de rassemblement. Les autres manipulations de l'électrophorèse sur polyacrylamide étant par ailleurs réalisées sans échangeant.

3.3.2. Méthodes avec Immuns absorbants

3.3.2.1. Principe

La polymérisation des Ac permet d'obtenir une phase solide sur laquelle il est possible de fixer les Ag susceptibles de réagir avec ces Ac.

3.3.2.2. Technique

Nous avons utilisé le protocole expérimental décrit par AVRAMEAS en 1967 (2). Dans un premier temps il s'agit de polymériser les IgG sous une forme précipitée insoluble, et dans une deuxième temps le polymère subit un traitement en vue de son utilisation comme immuno-absorbant.

Obtention du Polymère : nous avons utilisé à cet effet des IgG de lapin anti-S.H.N. du commerce (B.D. Mérieux). Nous avons contrôlé la pureté de ces Ac par I.E.P. contre un sérum de chèvre anti-sérum de lapin.

Cet anti-sérum était constitué essentiellement d'IgG, mais nous avons également mis en évidence un peu d'albumine et des traces de transferrine. La présence d'albumine nous fut très profitable, car elle assura un rôle de protection des IgG au cours de la polymérisation.

Nous avons procédé de la façon suivante :

- 2ml de sérum de lapin anti S.H.N. sont mélangés à 4 ml de tampon acétate 0,2 M pH 5.

- le pH de la solution obtenue doit être réajusté à 5 avec HCl N si nécessaire.

- Ajouter au mélange 0,05 à 0,1 ml de chloroformiate d'éthyl tout en maintenant une agitation constante à l'aide d'un agitateur magnétique. Pendant toute la durée de la polymérisation le pH doit être maintenu entre 4,5 et 5 avec de la soude N, car le pH tend à s'abaisser au cours du traitement.

Il faut attendre 10 à 30 minutes avant l'apparition d'une suspension d'abord opalescente puis d'une précipitation franche.

- Laisser au repos 24 heures à la température du laboratoire.

- Centrifuger

- contrôler le surnageant par un traitement identique

pour vérifier que la polymérisation a bien été aussi complète que possible.

Traitement du polymère :

- Disperser environ 100 mg de polymère insoluble humide dans 50 ml d'un tampon phosphate 0,2 M, 0,9 % Na cl, pH 7,2.

- Centrifuger

- Effectuer 5 lavages successifs du précipité par ce même tampon, 3 lavages avec une solution de carbonate de Na 0,1 %, et à nouveau 3 lavages avec le tampon phosphate.

- Ensuite réaliser autant de lavages qu'il sera nécessaire avec un tampon glycine -Hcl 0,2 M pH 2,2 jusqu'à ce que la densité optique du surnageant après centrifugation soit égale à 0 à une longueur d'onde de 280 nm.

- Enfin avec le tampon phosphate on ramène l'immun-polymère en suspension à pH 7.

- L'absorption proprement dite du L.C.R. est réalisée par mélange intime de 12 h. avec le polymère en quantité appropriée. (100 mg de polymère humide pour 30 à 40 mg d'antigène protéique.)

- Le surnageant est ensuite soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

3.4. Résultats

La méthode utilisant l'inclusion d'IgG dans le gel de rassemblement fut extrêmement décevante, nous n'avons jamais pu nous débarrasser complètement des fractions albumine et transferrine (conf. Photo N° 17)

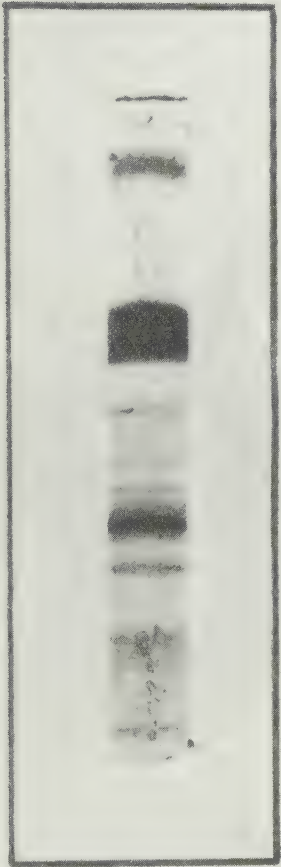
Par contre l'immuno-absorption sur IgG polymérisées nous a procuré des résultats nettement supérieurs. En effet, les surnageants du L.C.R. obtenus par ce traitement nous ont donné, après quelques mises au point, des images électrophorétiques apparemment exemptes de fractions sériques importantes comme l'albumine, la transferrine ou les Gamma globulines. (conf. Photo N° 18)

Les profils électrophorétiques ainsi obtenus ont l'aspect d'une succession de disques extrêmement fins et peu colorés à différents niveaux de la séparation.

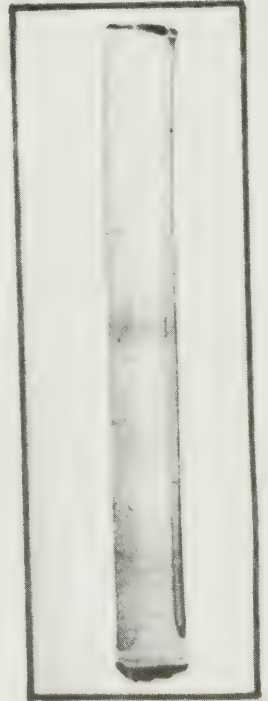
Sur la Photo N° 18 nous repérons par un index flêché les différentes fractions non absorbées.

3.5. Discussion

Après l'obtention de ces résultats, apparemment encourageants, nous avons tenté une identification immunologique de ces "protéines traces" restées sur le gel après immuno-absorption.



17



18

Cette tentative a été effectuée avec un anti-S.H.N. du commerce et avec notre anti-LCR, dans les deux cas nous n'avons jamais pu obtenir d'arc de précipitation, même après dilutions de nos anti-sérums.

Nous avons également réalisé une concentration de nos L.C.R. absorbés par lyophilisation, là encore, toute identification par immuno-diffusion fut impossible.

Devant les échecs répétés de l'immuno-diffusion, méthode peu sensible pour la mise en évidence de protéines à l'état de traces, nous avons pratiqué une électro-immuno-diffusion selon la technique décrite par LAURELL en 1965 (65). Nous avons procédé à partir des gels de séparation inclus dans la gélose contenant l'anti-sérum.

La tentative par cette méthode plus sensible s'est également révélée négative. Il est vrai que cette technique réalisée à partir d'électrophorèse en gel de P.A. sur LCR ou sur sérum, avec des anti-sérums du commerce, ne nous a jamais donné de très bons résultats.

Malgré cet échec partiel nous pensons qu'il existe une forte probabilité pour que les fractions repérées après immuno-absorption soient effectivement de nature "tissulaires" car nous avons réalisé souvent plusieurs immuno-absorptions successives sur un même L.C.R., augmentant ainsi les chances d'une élimination de plus en plus complète des fractions de nature sérique.

Néanmoins nous pensons que seules l'électrophorèse préparative et la chromatographie sur gel devraient nous apporter une solution satisfaisante à l'étude des protéines "tissulaires" du L.C.R. dans le cadre de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide, en permettant d'opérer sur de plus grandes quantités de protéines "tissulaires"

CHAPITRE III

=====

ESSAI DE CLASSIFICATION

DES PROFILS PROTEIQUES DU L.C.R.

1. INTRODUCTION

Les essais de classification des profils protéiques du L.C.R. ont été relativement nombreux dans le cadre désormais classique des techniques électrophorétiques utilisant comme support le papier, l'agar ou l'amidon.

Il nous faut citer celles de LABHART et coll. (1951), (57)
BUCHER et coll. (1952), SHONENBERG (1955) (96), ROUPERT (1956),
HABECK (1960) (44), LOWENTHAL (1964), LATERRE et MANUEL (1965),
DELANK (1965) (19), TCHICALOFF (1966) (100), BIZOUARD (1970)
(6) parmi les plus importantes.

Par contre les tentatives réalisées à partir de séparation sur gel de polycrylamide nous ont paru plus fragmentaires.

En s'appuyant d'une part sur les données fournies par le gel d'agar, d'autre part en nous fondant sur le diagnostic clinique quand il est certain, sur la teneur en protéines totales des échantillons de L.C.R., sur le profil électrophorétique en polyacrylamide de plus de 2.000 échantillons de ce liquide et sur les examens immuno-électrophorétiques, nous trouvons la justification de notre tentative.

2. CLASSIFICATION

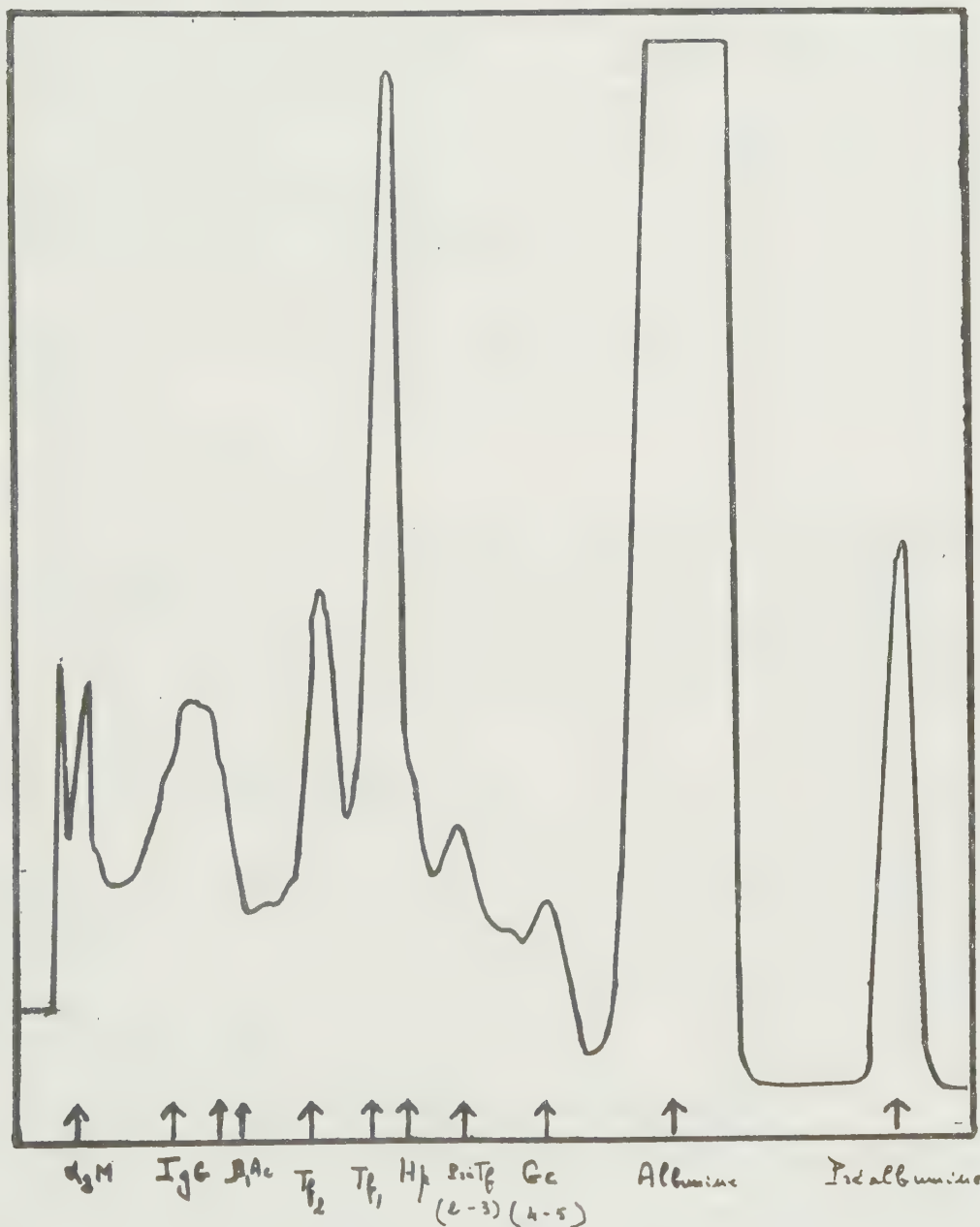
2.1. Terminologie

Nous proposons cinq profils protéiques généraux :
le profil normal, 3 profils déjà décrits par LATERRE en 1965 sur agar que nous transposons avec certaines modifications sur polyacrylamide, il s'agit des profils "transudatif", "dégénératif" et "gamma globulinique", et un profil supplémentaire que nous avons appelé "inflammatoire".

Nous pensons qu'en l'état actuel de nos connaissances sur la physio-pathologie des protéines du L.C.R. il nous paraît très aléatoire de multiplier le nombre des profils protéiques.



19



PROFIL NORMAL

Protéinorachie normale

- Préalbumine : Sommet du pic environ à mi-hauteur de celui de l'albumine
- Gc, prétransferrine 3 et 2, haptoglobine : hauteur de pics successivement croissante
- Rapport transferrine 1/transferrine 2 : égal à 2
- Immunoglobulines : pic d'aspect homogène (8 à 10 %)

Par contre l'expérience de tous les jours nous donne à penser que dans les années à venir la technique sur gel de polyacrylamide parallèlement à une connaissance toujours améliorée des protéines du L.C.R. devrait nous conduire à un partage de ces grands types de profils sous classes. En effet il nous est rapidement apparu que certains spectres protéiques se présentaient comme un mélange de caractères très divers appartenant à différents types de profils.

Dans un tout autre ordre d'idée, nous pensons qu'il est important de préciser le problème qui se pose dans le choix de la dénomination d'un profil. En effet, il ne faut pas oublier que le choix d'une terminologie pour un profil donné est motivé par des considérations bio-chimiques.

Aussi nous paraît-il exagéré d'établir des analogies abusives entre cette terminologie propre à un contexte bio-chimique et la terminologie habituellement utilisée en pathologie médicale. Nous avons repris une terminologie déjà entérinée par l'usage.

2.2. Profil "Normal"

Dans ce cadre nous avons établi notre profil à partir de L.C.R. dépourvu d'éléments et dont la protéinorachie ne dépassait pas 0,40 g/l. par la technique de MEULEMANS.

Du point de vue électrophorétique nous avons retenu 11 fractions pour établir ce profil. Nous présentons à la photo N° 19 un spectre électrophorétique normal et son tracé obtenu après enregistrement sur appareil automatique "Chromoscan".

2.2.1. Caractéristiques

Une fraction pré-albumine importante comparativement à celle d'un tracé de protéines sériques. (conf. Photo N° 3)
- Une fraction albumine dont le sommet du pic est écrêté.

- Une disposition particulière de pré-transferrines 5.4 et 3.2 qui montrent dans l'ordre des hauteurs de pic successivement croissantes.

- Une pré-transferrine 1 ou Haptoglobine (Hp) chevauchant le bord inférieur du pic de la Tf 1.

- Un rapport Tf 1/Tf2 égal à 2.

- Une bande Gamma globulines constituée par un pic d'aspect homogène (le plus souvent).

- A l'entrée du gel, une zone macroglobuline ou l'on trouve en très faible quantité l'Alpha 2 M.

2.3. Profils "Transudatifs" (conf. Photo N° 20)

L'image électrophorétique des protéines du L.C.R. tend à se rapprocher de celle obtenue avec les protéines sériques. (conf. Photo N° 3)

Ce phénomène résultant d'une transudation plasmatique excessive témoigne d'une altération de la barrière hémato-méningée. La protéinorachie est toujours augmentée, souvent jusqu'à plusieurs grammes/litre.

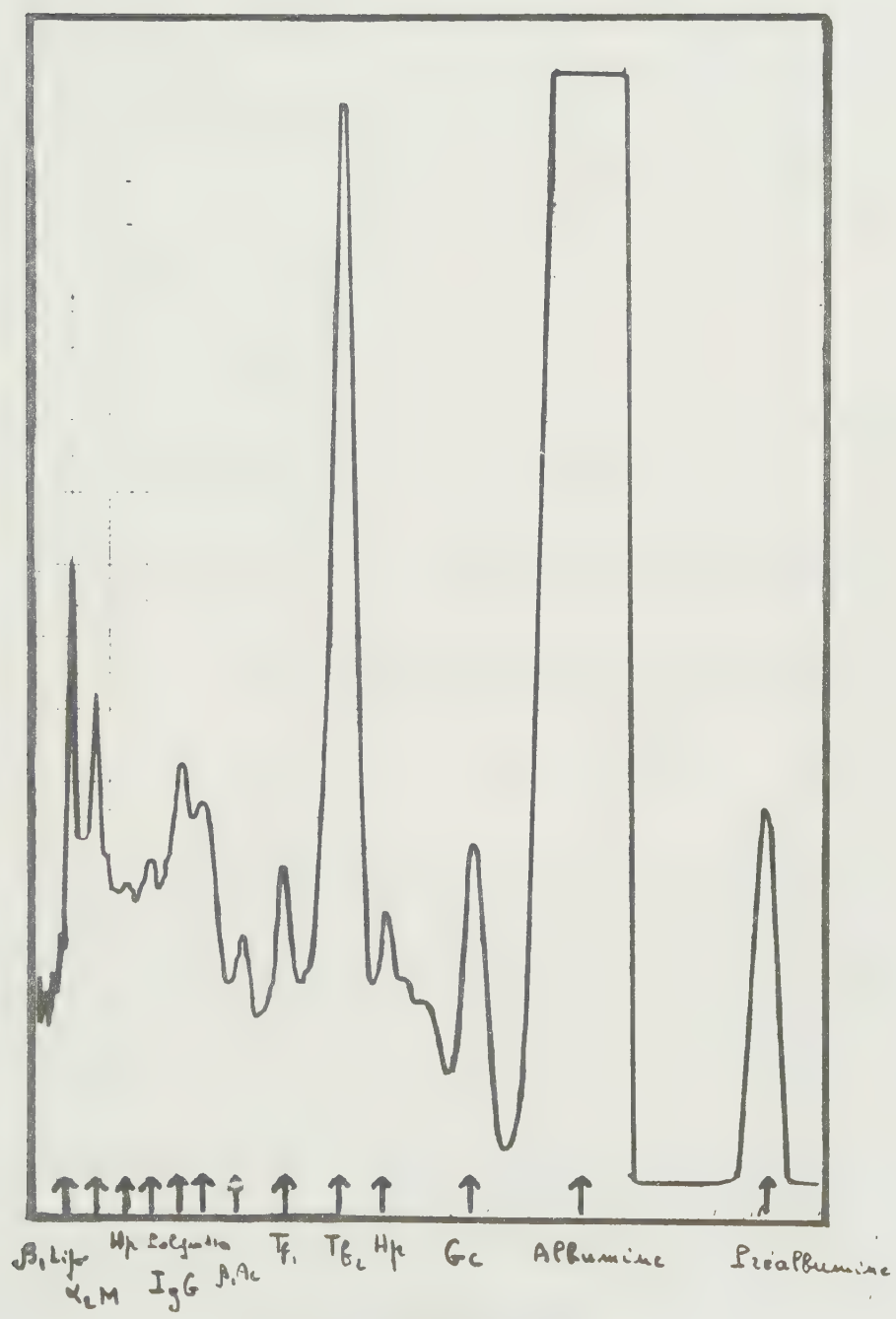
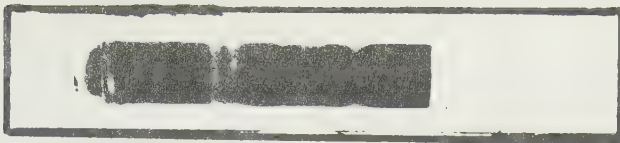
2.3.1. Caractéristiques

- Une pré-albumine toujours nettement diminuée.
 - Une fraction albumine légèrement augmentée
 - Une disposition inversée par rapport au profil normal des pré-transferrines, avec le plus souvent une forte augmentation des pré-transferrines 5 et 4 ("Gc : group component") les pré-transferrines 3 et 2 restant normales ou diminuées.
 - L'Haptoglobuline ou pré-transferrine I est le plus souvent augmentée.
 - Le rapport TfI/Tf2 est toujours très augmenté (par augmentation de la TfI)
 - Dans la zone post-transferrine on remarquera la présence d'un pic nettement individualisé, identifié à une fraction du complément (Béta I AC)
 - On note également une augmentation des gamma-Globulines se traduisant par une bande souvent homogène comparable à celle des gamma-globulines sériques (conf. Photo N° 3). Cette disposition les différencie des productions locales dont la distribution électrophorétique est discontinue. (Structure oligoclonale). L'aspect des gamma-globulines en électrophorèse sur gel de polyacrylamide est un élément important de la sémiologie des protéines du L.C.R.
- Parmi les gamma-globulines nous avons pu identifier à l'I.E.P. la présence d'IgG et d'IgA. Dans cette même zone nous avons également pu identifier des protéines sériques de haut poids moléculaires comme les polymères de l'Haptoglobine
- De même à l'entrée du gel nous avons pu identifier dans certains échantillons la présence anormale de Béta I lipoprotéine, et souvent une augmentation très nette de l'Alpha 2 macroglobuline (Alpha 2 M), qui existe toujours en très faible quantité dans le L.C.R. normal.

2.3.2. Aspects cliniques

Ce type de profil est retrouvé dans de très nombreuses et très diverses conditions cliniques. Il faut citer en premier lieu tout le groupe des maladies infectieuses que l'origine en soit bactérienne, virale ou mycosique, en particulier les infections méningées aiguës, les méningo-encéphalites aiguës, les abcès du cerveau, plus rarement les neurosyphilis et les poliomyélites antérieures aiguës.

Dans le cadre des affections tumorales, on trouve les infiltrations neuroméningées néoplasiques, certaines tumeurs cérébrales, les tumeurs médullaires avec blocage réalisant un syndrome de FROIN, c'est à dire apparition d'un coagulum dans le



PROFIL TRANSUDATIF

- Protéïnorachie augmentée jusqu'à plusieurs grammes/litre
- Préalbumine : très diminuée
 - Rapport transferrine 1/transferrine 2 : très augmenté
 - Immunoglobulines : plus ou moins augmentées et d'aspect homogène
 - Présence de polymères d'haptoglobine et de beta lipoprotéine : protéines sériques de haut poids moléculaire.

LCR. lors du prélèvement.

Dans un cadre plus divers nous avons retenu la plupart des polyradiculonévrites de type Guillain-Barré qui à notre avis réalisent le profil transudatif dans toutes ses caractéristiques. Certaines polyradiculonévrites atypiques et neuropathies diabétiques, la plupart des hernies discales lombaires, les hémorragies méningées ou cérébrales.

Cette courte énumération ne prétend aucunement présenter un catalogue complet des diverses affections pathologiques rencontrées à travers le profil "Transudatif".

2.4. Profil "Gamma" (conf. Photo N° 21)

2.4.1. Caractéristiques

La protéinorachie n'est que peu augmentée, rarement supérieur à 0,80 g/l, le plus souvent elle se situe dans les limites de la normale, et ceci représente une caractéristique importante de ce profil.

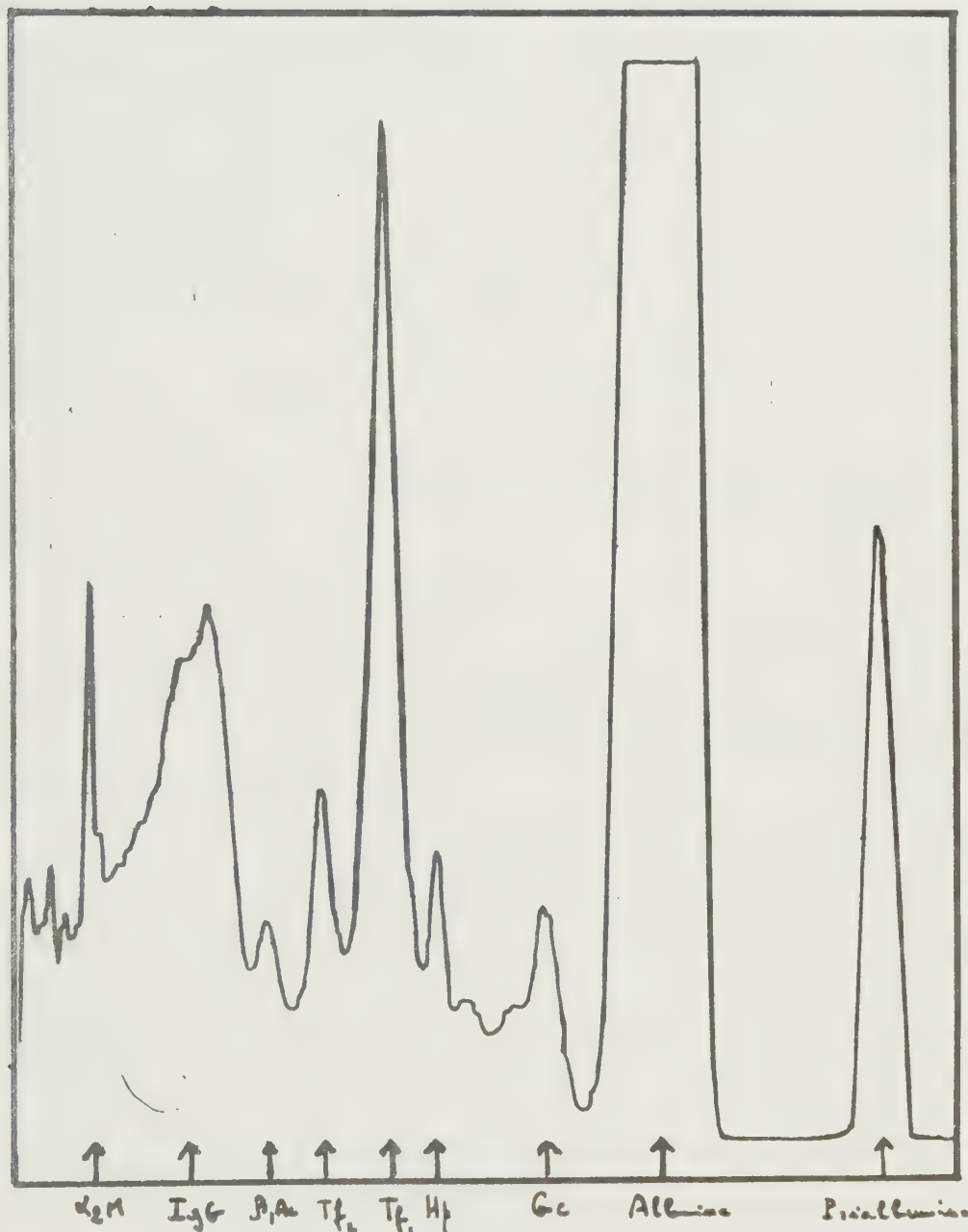
Du point de vue électrophorétique il présente essentiellement une augmentation sélective des Gamma-Globulines dont la morphologie particulière est de présenter une distribution discontinue.

- la pré-albumine et l'albumine restent normales
- Le rapport Tf1/Tf2 peut être légèrement augmenté ou normal.
- Les pré-transferrines 2 et 3 sont normales ou discrètement augmentées.

En fait il est important de souligner à ce propos que les profils "Gamma" purs, c'est à dire ceux qui présentent uniquement une augmentation des gamma-globulines sont en fait extrêmement rares, car le plus souvent ils présentent parallèlement une augmentation des glycoprotéines et de certaines fractions tissulaires. (ref. LOWENTHAL, LATERRE). Ce qui rend ce type de profil original ce n'est pas tant l'augmentation de ses gamma-globulines que leur distribution discontinue déjà mise en évidence par de nombreux auteurs.

LATERRE pour sa part emploie le terme de "structure oligoclonale". La bande gamma homogène du L.C.R. normal est remplacée par plusieurs bandes bien individualisées.

LOWENTHAL (65) individualise huit fractions Gamma globulines, répertoriées de Gamma 0 à Gamma 7 : pour ce même auteur les fractions rapides seraient bien représentées dans la Neurosyphilis, les fractions lentes dans la leuco-encéphalite sclérosante subaigüe, tandis que les fractions de mobilité moyenne seraient typiques de l'image gamma rencontrée dans la sclérose en plaque. A notre tour et après de nombreux auteurs, nos propres observations ont généralement confirmé cette topographie sur gel de polyacrylamide . (conf; Photo N° 26).



PROFIL GAMMA

Protéinorachie : normale ou légèrement augmentée

- Préalbumine : normale
- Prétransferrines 3 et 2 ; augmentées ou normales
- Rapport transferrine 1/transferrine 2 : augmenté ou normal
- Immunoglobulines : très augmentées dont la distribution électrophorétique est discontinue (structure oligoclonale).

2.4.2. Aspects cliniques

Classiquement on peut citer ici d'après LATERRE (61-62) CASTAIGNE (10) LOWENTHAL (65) CUTLER (17), la sclérose en plaque, la neurosyphilis, les leuco-encéphalites sclérosantes type Von Bogaert, et d'une façon plus générale toutes les méningo-encéphalites bactériennes parasitaires ou mycosiques évoluant vers la **chronicité**

Pour notre propre compte nous avons vérifié souvent ces données désormais classiques (conf. Photo N°24-25). Néanmoins en ce qui concerne les S.E.P nous pensons pouvoir dégager (des études statistiques étant en cours de réalisation) un profil particulier associant le plus souvent un profil gamma à un profil de type "Inflammatoire" que nous allons justement décrire.

2.5. Profil "Inflammatoire" (Photo N° 22)

Nos propres observations nous ont amené à créer ce type de profil car il présente des caractères nettement particuliers qui le distinguent aussi bien du profil gamma que du profil transudatif.

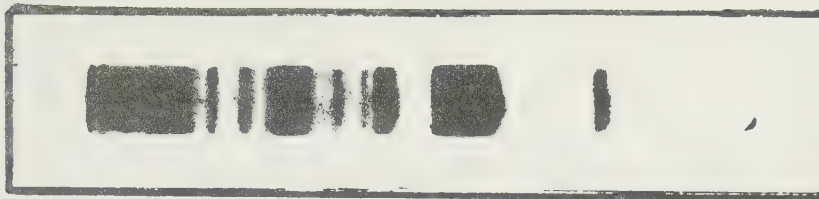
2.5.1. Caractéristiques

- La protéinorachie est en général légèrement augmentée, mais peut rester normale.
- La pré-albumine se trouve légèrement diminuée sans jamais atteindre l'effondrement typique qu'elle présente dans le profil transudatif.
- L'albumine est conservée
- Les pré-transferrines 4 et 5 sont augmentées
- Les pré-transferrines 2 et 3 sont normales
- L'Haptoglobine est augmentée
- Le rapport Tf1/Tf2 est augmenté avec une Tf2 diminuée.
- Les gamma-globulines sont en règle générale augmentées, leur distribution homogène ou discontinue, varie selon le type d'affection.
- Il n'y a jamais de grosses molécules comme la Béta I lipoprotéine.

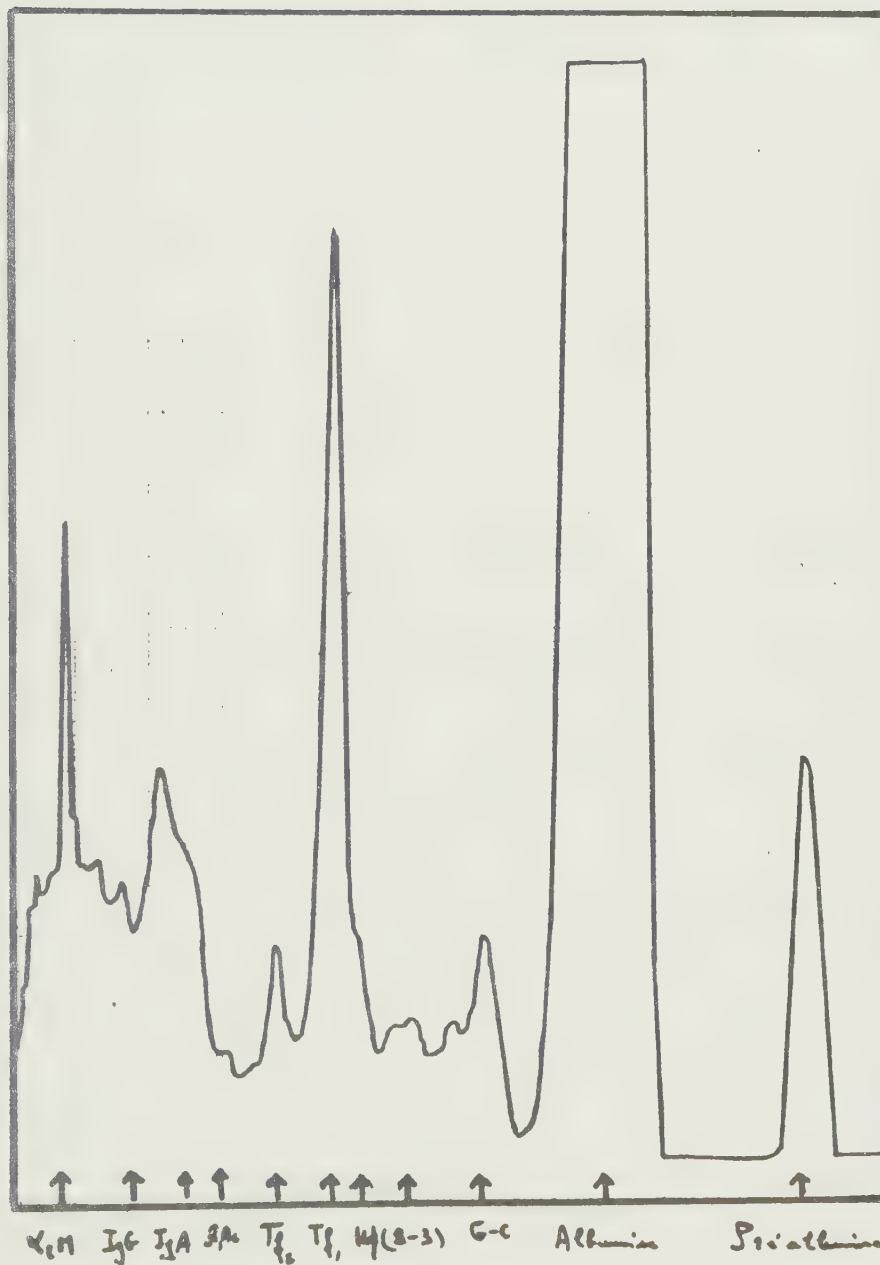
2.5.2. Aspects cliniques

Dans ce type de profil nous avons retenu les S.E.P, qui, comme nous l'avons remarqué sont souvent associées au profil gamma.

Nous avons également retenu certaines polynévrites et neuropathies diabétiques, quelques cas de polyradiculonévrites atypiques, certains états psychotiques et névrotiques associés parfois à des céphalées, et enfin les sciatiques.



22



PROFIL INFLAMMATOIRE

Protéinorachie : légèrement augmentée ou normale

-Préalbumine : légèrement diminuée

- Gc et haptoglobine : augmentées

- Rapport transferrine 1/transferrine 2 : augmenté (Tf₂ diminuée)

- Immunoglobulines : augmentées.

En l'état actuel de notre travail il est bien certain que nous n'avons pas encore tous les éléments d'information nécessaires dans ce type de profil pour en retirer un intérêt pratique. Seule une exploitation statistique de ce type de profil pourrait nous donner des renseignements plus précis.

2.6. Profil "Dégénératif"

Nous n'insisterons jamais trop sur le sens du mot "dégénératif", qui est à considérer ici dans son acception bio-chimique. Pour notre part, nous préférierions voir dénommer ce profil "Hyper L.C.R.", terminologie qui prend tout son sens quand on constate dans de tels liquides une augmentation très marquée des fractions les plus typiques du L.C.R. et tout particulièrement des protéines, de type tissulaire.

2.6.1. Caractéristiques

- La protéinorachie est normale ou basse.
- La pré-albumine est très augmentée, c'est là un caractère important.
- L'albumine est normale ou légèrement diminuée.
- Les pré-transferrines 4 et 5 sont normales ou diminuées.
- Les pré-transferrines 3 et 2 sont augmentées
- Le rapport Tf1/Tf2 est très diminué par augmentation de la Tf2. Selon l'hypothèse de LATERRE il existerait une certaine activité neuraminidasique, dans le L.C.R. normal ($Rf1/Tf2 = 2$).

Dans certaines conditions de souffrance du tissu cérébral ou dans certains types de lésions on constaterait une augmentation de cette activité enzymatique, due à la libération de cette enzyme.

Si l'on sait que le tissu cérébral est riche en neuraminidase cela ne nous étonnera pas trop.

Autrement dit plus l'activité neuraminidasique du L.C.R. augmente, plus il y a de chance pour que la fraction "Tf2" dénommée classiquement "Tau" se trouve augmentée.

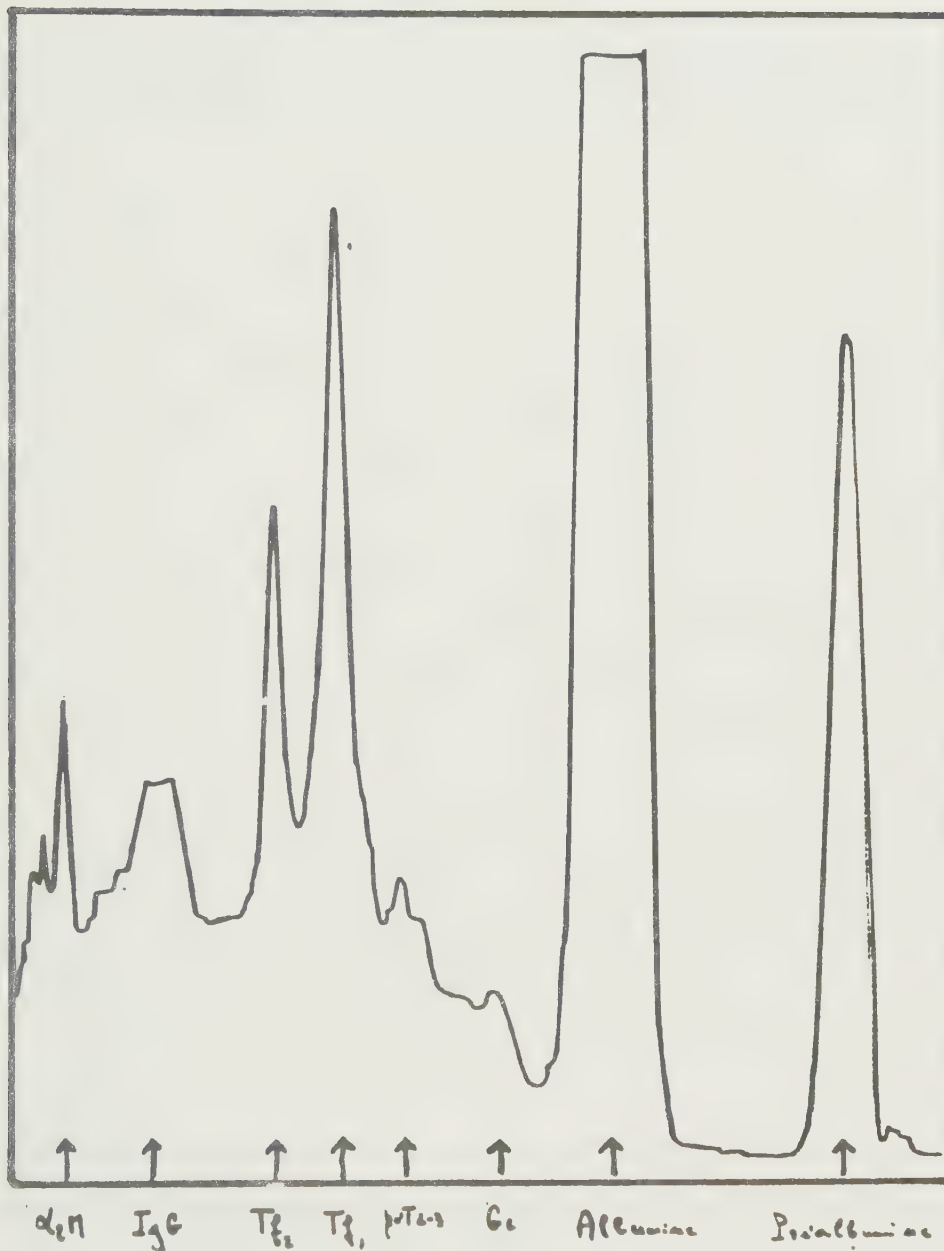
Les Gamma-globulines sont classiquement diminuées, mais il est fréquent qu'elles restent normales.

Comme pour le profil gamma, le profil dégénératif pur est extrêmement rare (conf. Photo N° 23) souvent il associe d'autres caractères empruntés aux autres profils.

2.6.2. Aspects cliniques

Le profil dégénératif, malgré son nom, se rencontre dans des affections neurologiques très diverses.

En effet, il ne correspond à aucune spécificité sur le plan clinique.



PROFIL DEGENERATIF

Protéinorachie : normale ou basse.

- Préalbumine : très augmentée
- Albumine : Légèrement diminuée
- Prétransferrines 2 et 3 : marquées
- Rapport transferrine 1/transferrine 2 : très diminué par augmentation de Tf_2
- Immunoglobulines : basses.

Pour de nombreux auteurs on le rencontre peut-être avec une plus grande fréquence dans les atrophies cérébrales et cérébelleuses, fait que nous avons le plus souvent constaté.

Il faut mentionner encore la sclérose cérébrale combinée, certaines neuropathies et encéphalopathies, certains états névrotiques, et psychotiques, la démence présénile certaines sciatiques, certains états d'artériosclérose cérébrale.

2.7. Profils particuliers

Dans ce paragraphe nous avons pensé nous limiter à quelques considérations particulières sur certaines anomalies protéiques importantes que l'on peut rencontrer dans le L.C.R. Dans ce cadre nous voulons parler essentiellement des para-protéines rencontrées dans ce liquide.

En effet, dans ces cas là après avoir identifié la para-protéine dans le L.C.R., il est important de connaître le I.E.P. du sérum.

C'est ainsi que nous rapportons ici un cas de macroglobulinorachie, caractérisée par une sécrétion importante dans le L.C.R. d'IgM (thèse CHAZOT)(conf. Photo N° 29), qui était relativement plus importante dans le L.C.R. que dans le sang.

En parallèle nous présentons quelques images de para-protéines de type IgA et IgG observées dans certains tracés électrophorétiques de L.C.R. (conf. Photo N° 28) le plus souvent après étude du sérum fut retrouvée cette para-protéine. (conf. Photo N° 30)

Par ailleurs nous avons également observé au cours de certaines affections tumorales des images de dédoublement des transferrines I et 2 en 4 fractions, nous pensons qu'il peut s'agir d'un phénomène lié à un problème génétique (conf. Photo N° 32) du à un hétérozygotisme C,B ou C,D cependant l'hypothèse que cette transformation puisse être liée à l'état pathologique ne peut-être écartée.

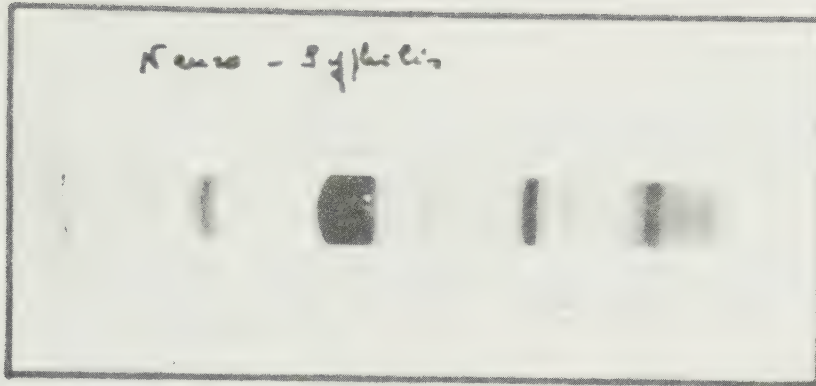
Malheureusement nous n'avons pas pu expertiser le sérum de ces patients et montrer si l'existence de ce dédoublement était présent dans le sérum.

3. DISCUSSION

Après avoir examiné d'une façon assez sommaire, les incidences de nos investigations bio-chimiques sur les aspects cliniques de la pathologie neurologique, nous sommes en droit de nous demander quelle place occupe parmi d'autres explorations, l'électrophorèse des protéines du L.C.R. sur gel de polyacrylamide, dans une contribution diagnostique.

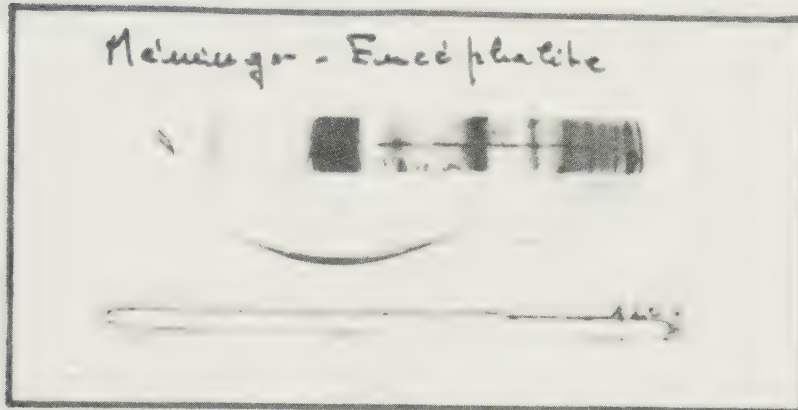
Avant d'émettre une opinion, nous avons tenu à préciser que dans le domaine si particulier de la Neurologie, la biologie n'occupe bien souvent qu'une place modeste, la clinique restant l'élément fondamental du diagnostic.

Neuro - Syphilis



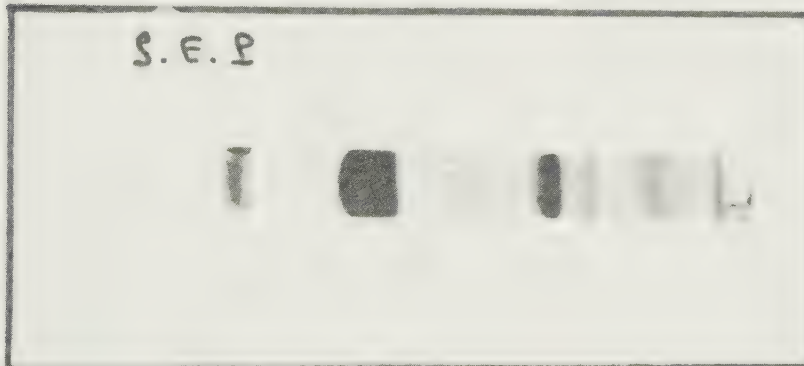
(24)

Meningo - Encephalitis



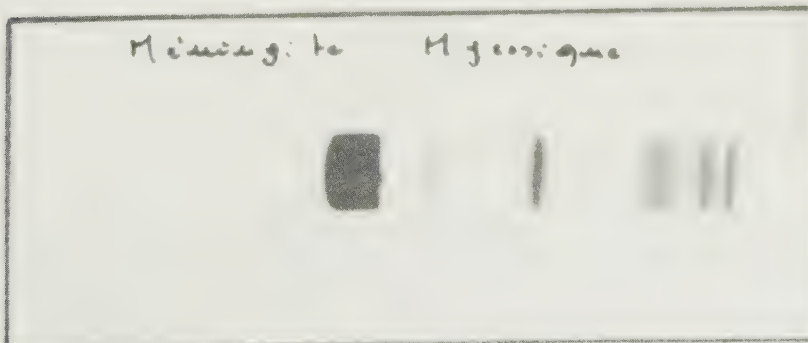
(25)

S.E.P



(26)

Meningitis Myelogram

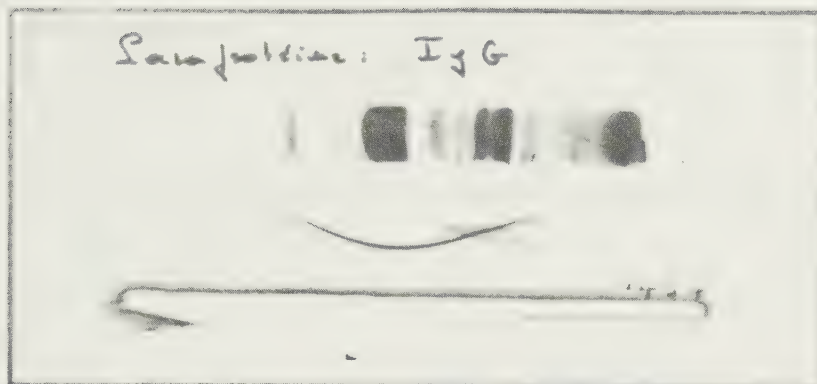


(27)

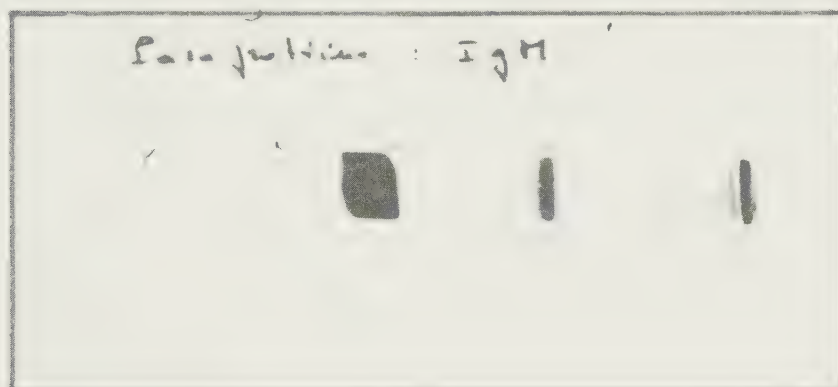
Nous ne reviendrons pas sur les si nombreux avantages techniques apportés par l'Electrophorèse sur gel de polyacrylamide, en particulier c'est une méthode qui ne réclame au grand maximum que 0,6 ml de L.C.R., tout en évitant la concentration préalable du liquide spinal.

En outre, c'est une technique qui nous a permis d'améliorer souvent la finesse des profils protéiques déjà obtenus par d'autres méthodes.

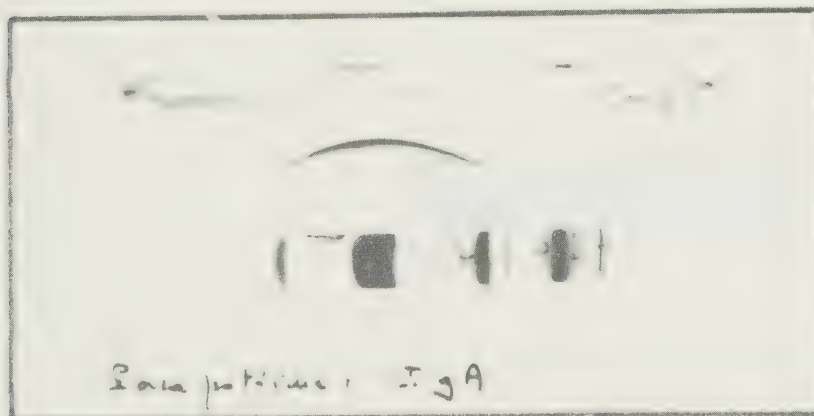
A ce titre notre contribution se présente comme un élément supplémentaire parmi d'autres explorations réalisées au cours de problèmes diagnostiques, parfois difficiles, que les cliniciens ont à résoudre.



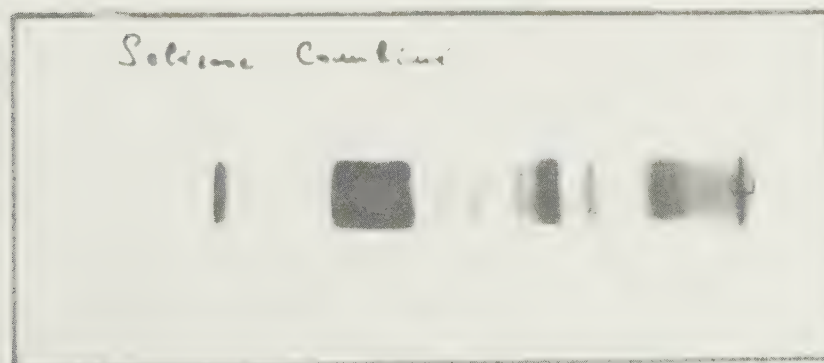
28



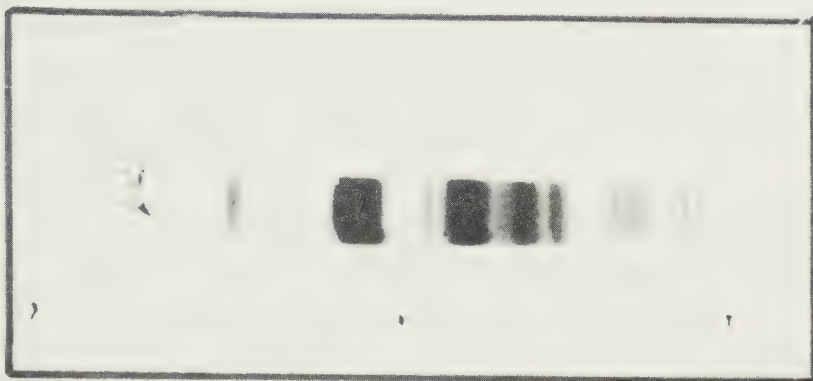
29



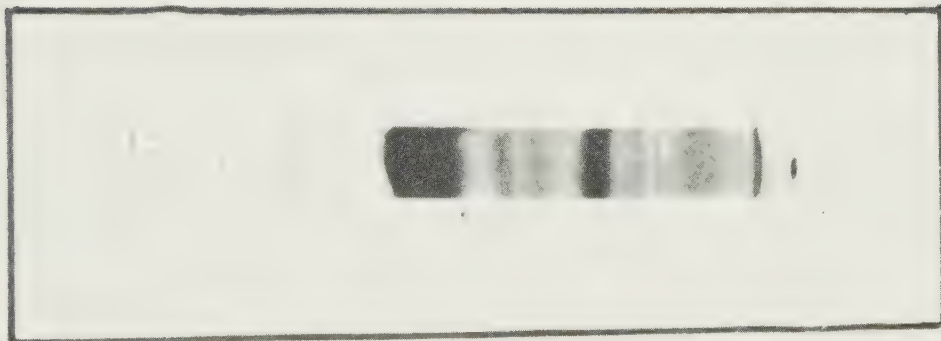
30



31



32



33

CONCLUSIONS

Les Protéines du L. C. R. ont, jusqu'à ce jour, été étudiées d'une façon bien approfondie dans le cadre des méthodes classiques de l'électrophorèse et de l'I. E. P.

Par contre, nous avons constaté que les études étaient plus fragmentaires dans ce domaine avec des techniques modernes comme la méthode du "Disc electrophoresis" introduit en 1964 par ORSTEIN et DAVIS.

Dans la première partie de notre travail, nous avons essayé de présenter une synthèse des différentes méthodes qui ont permis à de nombreux auteurs l'étude des protéines du L. C. R. Chacune d'entre elles comme nous l'avons montré, présente d'incontestables mérites mais aucune n'est totalement exempte de critiques. Chaque fois que cela fut possible, nous avons rassemblé les principaux résultats fournis par chaque type de méthode.

La Seconde partie, réservée à nos résultats personnels, est centrée sur une étude électrophorétique du L. C. R. sur gel de polyacrylamide.

Nous avons pu séparer jusqu'à 14 fractions dans les cas les plus favorables avec un chiffre minimum de 11.

Parallèlement, nous avons essayé d'identifier, au moyen d'anti-sérums monospécifiques, la plupart de ces fractions par une méthode immunologique classique, l'immuno-diffusion, à partir de chaque disque découpé minutieusement sur le gel et inclus sur une plaque de gélose.

Le Président de la Thèse :

VU et permis d'imprimer

LYON, le

VU, le Doyen :

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,

CONCLUSIONS

En outre, avec une technique d'immuno-absorption permettant la fixation spécifique des protéines sériques du L. C. R. par des IgG polymérisées, nous avons tenté de localiser puis d'identifier certaines fractions "tissulaires" de ce liquide.

Il nous a fallu tout d'abord préparer un sérum anti-L.C.R. Après absorption de cet anti-sérum sur S. H. N. lyophilisé, nous avons pu montrer qu'il possédait une certaine activité anti "Béta a T" et anti "Delta a T", fractions représentant quantitativement la part la plus importante des protéines "tissulaires" du L. C. R.

Après traitement du L. C. R. par "immun polymères" anti- S. H. N. nous avons pu obtenir des spectres électrophorétiques particuliers qui montrent une image constituée d'un certain nombre de disques extrêmement fins et légèrement colorés.

Des tentatives multiples n'ont jamais pu fournir la preuve immunologique que ces fractions ainsi révélées après immuno-absorption du L. C. R. étaient effectivement des fractions "tissulaires".

De même, nous n'avons pas pu prouver qu'il s'agissait de fractions sériques qui auraient échappé à l'absorption. Cette impossibilité de montrer la nature sérique ou tissulaire de ces fractions nous a paru liée à la quantité extrêmement faible de protéines mises en jeu avec la technique sur polyacrylamide.

Le Président de la Thèse :

VU et permis d'imprimer
LYON, le

VU, le Doyen :

Le Recteur, Président du
Conseil de l'Université,

CONCLUSIONS

Enfin, nous appuyant d'une part sur certaines données de la littérature, d'autre part sur l'expérience déjà longue de quatre années, du laboratoire de Biochimie de la Pharmacie de l'Hopital Neurologique, dans ce domaine si particulier des protéines du L. C. R., nous avons dégagé dans une perspective diagnostique cinq types de profils : normal, inflammatoire, transudatif, gamma et dégénératif.

Nous souhaitons voir se prolonger rapidement cette étude par l'exploitation statistique d'un ensemble de résultats portant sur plus de 2000 échantillons de L.C.R. prélevés chez des patients au cours de diverses affections neurologiques.

Le Président de la Thèse :

VU et permis d'imprimer

LYON, le 7 décembre 1971

Le Président de l'Université

~~Le Recteur~~ CLAUDE BERNARD,
Conseil de l'Université

VU, ~~Le Docteur~~ Le Directeur de
l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques,

Maurice CARRAZ

J. BOIDIN



BIBLIOGRAPHIE

=====

- I - ALAJOUANINE Th. ,FOURNIER Et.et GERVAIS P. - Dysprotéïnorachie
la réaction des bêta-lipoprotéïnes dans le liquide céphalo-
rachidien.
Presse Méd. II, 385-386, 1960
- 2 - AVRAMEAS S. and TERNYNCK Th. - Biologically active water-
insoluble protein polymers. I. their use for isolation of
antigens and anti-bodies .
J. of Biol. Chem 242, N° 7, 1651-59, 1967
- 3 - BAMMER H. - Demonstration of the Béta I C globulin as a normal
constituent of the CSF by I.E.P.
Klin. Wschr. 41, 1087-7, 15 NOV. 63
- 4 - BLAU J.N. ,HARRIS H. , ROBSON E.B. - Haptoglobins in cerebro-
spinal fluid.
Clin. Chim. Acta Pays-Bas, 8, N° 2, 202-6, 1963
- 5 - BRACKENRIDGE.C.J. - Cerebrospinal fluid protein fractions in
health and disease.
J. Chim. Path. ,15 , 206-210 1962
- 6 - BUCHER M., MATZELT D. und PETTE D. - papier elektrophorese von
liquor cerebrospinalis.
Klin. Woch. , 30 , 325-330, 1952
- 7 - BURSTEIN M. et SAMAILLE J. - Dosage des bêta-lipoprotéïnes sériques
après précipitation sélective par l'héparine
Presse. Med. 43, 974-975, 1958
- 8 - BURTIN - Etude sur les prot. du liquide céphalo-rachidien.
Clin.Chem. Acta. 4 , 72, 1959
- 9 - CANAL N. - L'elettroforesi su gel di agar del liquido cefalo-rachi-
diano. Indagini sul significato delle variazioni delle frazioni
alfa-globuliniche in varie condizioni patologiche.
Sist. New. , 14, 77-89, 1962
- 10 - CASTAIGNE P. et al. - Proteins content of CSF in S.M.
Marseille Med. 104, 43 - 63 , 1967
- II - CHAZOT Guy - Pseudolymphome de l'orbite. Macroglobulinosécrétion.
Macroglobulinorachie. Méningolymphomatose.
Thèse Med. Lyon 18 Déc. 1968

- I2 - CHRAMBACH A. n REISFELD A. , WYCROFF M. and ZACCARI J. - A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis.
Anal. Biochim. 20, 150 - 154, 1967
- I3 - CLAUSEN J. - Proteins in normal cerebrospinal fluid not found in serum.
Proc. Soc. exp. Biol. (N/Y.) 107, 170, 1961
- I4 - CLAUSEN J., GERHARDT - Agar-gel microelectrophoresis of proteins in the CSF. normal and pathological findings.
Acta Neurol. Scand 40 suppl. 10, 57 - 64 , 1964
- I5 - COLOVER J, FEINBERG J.G. , TEMPLE A. - A comparaisn of the measurement of gamma-globulin in cerebrospinal fluid by electrophoretic and immunological methods.
J. Clin. Patho. 16, 370 - 374 , 1963
- I6 - CUMINGS J.N. et SHORTMAN R.C. - Polyacrylamide disc electrophoresis of cerebrospinal fluid and cerebral cyst fluids.
Clin. Chem. acta 27, 29-34 , Jan. 70
- I7 - CUTLER R.W. et al. - Origin of CSF gamma globulin in subacute sclerosing leuco-encephalitis
Arch. Neurol. (Chicago), 17 , 620 -8, 1967
- I8 - DELANK H.W. - Das eiweissbild der liquor cerebrospinalis und seine klinische bedeutung.
Darmstadt steinkopff XI, 97 p. (Fortschütte der Immunitätsforschung Bd 6) 1965
Nr. Fo8 site, Bd 6, Cit. No 34 434 , 1965
- I9 - DELANK H.W. - The CSF protein picture and its chemical significance.
Fortschr. Immunitarts forsch 6, 1-97, 65
- 20 - DELANK H.W. - Chimical experience with polyacrylamide-electrophores analyses of cerebrospinal fluid proteins
Klin Wschr 46, 779 - 83, 15juil. 68
- 21 - DELANK H.W. et al. - Chnical value of quantitative immuno-chemical determinations of various proteins in the cerebrospinal fluid
Klin. Wschr, 47 , 1270 - 5 , 1 déc. 69
- 22 - DENCKER S.J., SWAHN R. - The diagnostic value of lipoprotein determination in C.S.F.
Acta psychiat. Scand. 362 , 325 , 1961

- 23 - DENCKER S.J., BRONNESTAMR, SWAHN B. - Demonstration of large
flood proteins in cerebrospinal fluid.
Neurology. II, 44I, 196I
- 24- DETERMANN Helnrut. - Gel chromatography.
Chapitre 2 : Material and methods p. 17
Springer Terlag Berlin Heidelberg New.York 1968
- 25 - DIESSNER H., SCHORIDI R.M. - Polyacrylamide electrophoresis in
neuro- psychiatric diagnosis.
Clin. Chem. acta 25, 153 - 9 , ju 69
- 26 - EATON J. et GARDNER M. - Separation of cerebrospinal fluid
proteins by paper electrophoresis
Bioch. J. 55, 35 - 36, 1953
- 27 - ELBERT A. PETERSON and ELLEN A. CHIAZZE - Some experimental
factors in the gradient chromatography of serum proteins
Arch. Bioch. and Biophysies 99, 136-147, 1962
- 28 - ELEVITCH F.R., ARONSON et coll. - Thin gel electrophoresis in
agarose.
Am. J. Chim. Patho. 46, 692 - 693, 1966
- 29 - ESSER H. - Ein einfaches verfahren der einengung des liquor
cerebrospinalis sur fast immung der einverfaktianen mit
hilphe der electrophorese in filter papier
Klin. Wschr. 30, (9 -10), 228 -229, 1952
- 30 - EVANS J.H. and QUICK D.T. - Polyacrylamide gel electroph. of
spinal fluid proteins
Clin. Chim. 12, 28 - 36 , Jan 66
- 31 - EVANS J.H. and DONALMT. QUICK. - Polyacrylamide gel electroph. of
CSF proteins, in neurological disorders.
Arch. Neurol. (Chicago) 14, 64 - 72 Janv. 66
- 32 - FELGENHAVER K., BACH S., STAMMLER A. , - Electrophos. von serum
und liquor cerebrospinalis in polyacrylamide gel
Klin. Wschr. Stsch. 45, N° 7, 37I -7, 1967
- 33 - FINE J.M., LOEB J. - I Electrophorese en gel d'amidon
II. Proteines et lipoprotéines du sérum humain
Rev. Hémato. 195, 13-(4) 449 (9), 1958
- 34 - FINE J.M., MOURAY H., MORETTI J. - Influence de la composition
des tampons sur la séparation des protéines en électrophorèse
d'amidon
Clin. Chem Acta 7, 346 - 9 , 1962

- 35 - FIRNHABER W. - On the demonstration of complement in the CSF
Z. Immun Allergie Forsch. 126, 145-7, 1964
- 36 - FRICK E. - Quantitative bestimmung des transferrins in normalen
und pathologischen. Liquor cerebrospinalis.
Klin Wschr 41, 75 - 78, 1963
- 37 - GRABAR P. et WILLIAMS C.A. - Méthode immuno-electrophorétique
d'analyse de mélanges de substances antigéniques
Bio-chim. Biophys. Acta 17, 67 - 74, 1959
- 38 - GRABAR P. et NURTIN P. - Analyse immuno-électrophorétique
Masson et Cie. Id. Paris, I vol. 294 J. 1960
- 39 - GERVAIS Pierre - Le profil protidique du liquide céphalo-rachidien
Paris, R. Vezin, 24x15,5, 114 pp. 6 depl. Tabl., 1958
Thèse Med. Paris N° 535, 1958
- 40 - GOA J. and TVETEN L. - Electrophoresis of cerebrospinal fluid
proteins in certain neurological diseases.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 15, 152 - 158, 1963
- 41 - GOODMAN M. and VULPE M.A. - A quantitative immunochemical method
for determining serum and cerebrospinal fluid proteins
Wld. Neurol. 2, 589 - 601, 1961
- 42 - GRASSMANN W. et HANNIG K. - Über ein verfahren zur electrophore-
tischen bestimmung der serum protein auf filter papier
Dtsch. Med. Wschr 11, 333 - 336, 1951
- 43 - GRIES G., ALY F.W. - Zur methodik der pappe elektrophores des
liquor cerebrospinalis
Klin. Woch. 31, 644 - 649, 1953
- 44 - HABECK D. Die papier elektrophorese der eiweisskörper des liquor
cerebrospinalis.
Psychiat. Neurol. (Basel) 139, 185 - 204, 1960
- 45 - HANOK A. - A micro modification of a method for the measurement
of globulin in cerebrospinal fluid and its application in
diagnosis of multiple sclerosis.
J. Lab. Clin. Med. 57, 42 - 46, 1961
- 46 - HOCHWALD G.M., THORBECKE G.J. - Trace protein in cerebrospinal
fluid and others biological fluids. I. effect of various func-
tionation procedur on beta-trace and gamma-trace proteins
and methodes for isolation of both proteins
Acch. Biochem. 101, 325 - 324, 1963

- 47 - HOCHWALD G.M., THORBECKE G.J. - Trace proteins in biological fluids. physico-chemical properties and sites of formation of gamma-trace and beta-trace
Prec. Soc. Exp. Biol. Med. 124 (3), 961 - 6 , 1967
- 48 - JENSEN K. - Ceruloplasmin in human cerebrospinal fluid
Acta. Neurol. Scand. 39, 237-41, 1963
- 49 - KABAT E.A., GLUSMAN M. and KNAUB V. - Quantitative estimation of the albumin and gamma globulin in normal and pathologic cerebrospinal fluid by immuno-chemical methods.
Amere. J. Med. 4 , 653 - 662 , 1948
- 50 - KAFKA V. - Taschenbuch der praktischer untersuchungs methoden der körperflüssigkeit bei nerven und geisteskrankheiten.
5 Aufl., Karger, Basel, New York, 1948
- 51 - KAPLAN A. - Electrophoresis of CSF Proteins
Amer. J. Med. Ser 153, 549 - 55, Mar. 1967
- 52 - KAPLAN A. and JOHNSTONE M. - Concentration of CSF proteins and their fractions by cellulose acetate
Clin. Chem. 12, 717 - 27 Oct. 1966
- 53 - KRAUSE H. - Zur elektrophorese des liquor cerebrospinalis auf cellulose acetat-folien
Dtsche Gesundh. Wes 22, N° 26, 1218-21, 1967
- 54 - KRAUSE H. - Studies on the determination of total cerebrospinal proteins using a modified Extent reagent
Deutsch Gesundh 23, 261 - 3 Feb. 1968
- 55 - KRAUSE H. - On electrophoresis of cerebrospinal fluid on cellulose acetate films
Dentsch gesundh 22, 1218 - 20 , 20 Jan. 1967
- 56 - KUTT H. Mac DOWELL F. , CHAPMAN L. - Abnormal protein fraction in cerebrospinal fluid demonstration by starch gel electrophoresis.
Neurology. 10, 1, 1960
- 57 - LABHART H., SCWEITZER W. - Mikroelektrophoretische untersuchungen von normalen und pathologischen liquor cerebrospinalis
Confin. Neurol. 11, 325 - 339 , 1951
- 58 - LATERRE E.C. - A note on proteins apparently 'specific' for cerebrospinal fluid.
Clin Chem. Acta Pays Bas , 8 , N° 2, 220- 6 , 1963

- 59 - LATERRE E.C., HEREMANS J.F. n CARBONARA A.O. - Immuno-chemical
comparaison of somme proteins found in cerebrospinal fluid,
urine and extracts of brain and kidney.
Clin. Chim. Acta 10, 197, 1964
- 60 - LATERRE F.C. - Les protéines du liquide céphalo-rachidien à l'état
normal et pathologique
Ed. Arscia S. A., Bruxelles, I vol. 327 p., 1965
- 61 - LATERRE E.C. - Agar gel electrophoresis of CSF proteins semeiology
of the gamma zone
Acta neurol. Bel. 66, 289 - 304 Ap. 1966
- 62 - LAURELL C.B. - Antigen antibody crossed electrophoresis
Analyt. Biochim. 10, 358 - 361, 1965
- 63 - LEMMEN L.J., NEWMAN N.A. - Study of cerebrospinal fluid proteins
with paper electrophoresis.
Univ. Mich. Med. Bull. 23, 3 - 32 ; 1957
- 64 - LINK H. - IgG and low molecular weight proteins in humann cerebro-
spinal fluid
Acta Neurol. Scand. 43, Suppl.28, 1967
- 65 - LOWENTHAL A. - Agar gel electrophoresis in neurology
El sevier. Publ. Co, éd. Amsterdam, I vol. 204p. , 1964
- 66 - LUNEY J., CHRAMBACH A. , RODBARD D. - Factors affecting resolution
bandwidth, number of theoritical plates and apparent diffusion
coefficients in polyacrylamide gel electrophoresis
Anal. Biochim. 40, 158 - 73 , 1971
- 67 - Mac PHERSON C.F. - Purification of the gamma globulin characteristic
of cerebrospinal fluid
Canad. J. Biochim. 40, 1811, 1962
- 68 - Mc. PHERSON C.F. - Quantitative estimation of the gamma globulin
innormal and pathological cerebrospinal fluids by on immuno-
chemical method
Clin. Chem. Acta 11, 298, 1965
- 69 - MANCINI G., VAERMAN J.P. n CARBONARA A.D. and HEREMANS J.F. - A
simple radial-diffusion method for the immunological quantita-
tion of proteins, in H. Peeters (Ed.) ; "Protides of the
biological fluids" , proceeding of the 11th. Colloquim ,
Bruges, 1963
Elsevier , Amsterdam p. 370 , 1963

- 70 - MANCINI G, VAERMAN J.P., CARBONAVA A.Q. and HEREMANS J.F. and H. Peeters (ed.) - Proc. XI tj coll. protides of the biological fluids, brugge 1963 S. 370 Amsterdam. Elseviers 1964
- 71 - MANUEL Y. - Les proteines du liquide céphalo-rachidien (thèse Doct.Sci.Phys.) Lyon N° 366 , 1965
Lyon Vaulx en velin imp.HM offset In 4, II0 p. 1965
- 72 - MANUEL Y. et LATERRE E.C. - The proteins of normal CSF, descriptive study
Path. Biol. (PARIS) 14, 1040 - 7 Nov. 1966
- 73 - MANUEL Y. et LATERRE E.C. - Les protéines du liquide céphalo-rachidien normal - II - Origine des protéines du liquide céphalo-rachidien
Path. Biol. 14, N°23-24 , 1145-1156 , 1966
- 74 - MARAVI E. - Immunologie study of the cerebrospinal fluid proteins
Rev. Neurol. (PARIS) 117, 587-7 , Oct. 1967
- 75 - MAURIN Pl. et NEUZIL E. - Cerebrospinal fluid protein electrophoresis in neurological protein on personal experience
Bordeaux Med. 3, 299 - 315 , Feb. 1970
- 76 - METAIS P., WARTER H. and ROUPERT G. - L'electrophorèse des protéines du liquide céphalo-rachidiens
AM. Biol. Clin. 15, 7 - 9, (398) , 1957
- 77 - MEULEMANS O. - Determination of total protein in spinal fluid with sulphosalicylic acid and trichloroacetic acid
Clin. Chim. Acta 5, 757 - 761 , 1960
- 78 - MONSEU G., CUMINGS J.N. - Polyacrylamide disc electrophoresis of the proteins of cerebrospinal fluid and brain
J/ Neurol. Neurosur. Psychiatry G.G. 28, N°1, 56-60, 1965
- 79 - NEUZIL E. et MAURIN Philippe - Les proteines du liquide céphalo-rachidien. Etude electrophorétique et immuno-electrophorétique applications diagnostiques.
Problèmes actuels de biochimie appliquée (3ème série)
Ed. Masson et Cie, Paris 3ème série, I vol. 242 p., section V
Chap. 2,3,4, P. 208-232, 1970
- 80 - ORNSTEIN L. - Disc electrophoresis I. Background and theory.
Su. NY Acad. Sci. 121, 321 , 1964
- 81 - ORNSTEIN L. and DAVIS B.J. - "Disk electrophoresis, part I. Theory"
"Disk electrophoresis. Part II. Material and methods". Reprinted by canalco and distillation products, industries, div Eastmann Kodak compagny. Rochester N.Y. Jan. 1962.

- 82 - OUCHTERLONY O. - Gel diffusion methods for immunological analysis
• IV Congresso internazionale di microbiologia, II, 276, 1953
- 83 - PAPADOPOULOS N.M. HEPS W.C. O'DOHERTY - A procedure for the
détermination of cerebrospinal fluid total protein and gamma
globulin in neurologic disorder
Clin. Chim. 5, 567-574, 1959
- 84 - PARKER W.C. and BEARN A.G. - Studies on the transferrins of
adult serum, cord serum, and cerebrospinal fluid, the affect of
neuraminidase.
J. Exp. Med. 115, 83 - 105, 1962
- 85 - PAUTRIZEL - I.N.S.R.R.M. de Bordeaux
Service d'Immunologie des maladies parasitaires
- 86 - PERT J.H. et KUTT H. - Zone electrophoresis of cerebrospinal fluid
protein in starch gel.
Proc. Soc. Exp. Biol. 99, 181, 1958
- 87 - PETTE D. and STUPP I. - Die Tau fraktion in liquor cerebrospinalis
Klin. Wschr. 38, 109-110, 1960
- 88 - PRESS E.M. - A comparative study of cerebrospinal fluid and serum
proteins in multiple sclerosis with special reference to the
large colloidal gold reaction
Biochim. J. 63, 367 - 372, 1956
- 89 - RICE J.D., BLEAKNEY J.F. - Electrof. of unconcentrated CSF
using cellulose acetate strips and the dye nigrosin
Clin. Chim. acta 12, 343 - 8 ; ; 1965
- 90 - ROBERT L.F. and WILLIAM F. BLATT - Quantitative immuno assay by
disc electrophoresis.
Bioch. Pharmac. Div. U.S. Army Research institute of environmen-
tal Medicine, Natick Mass. (U.S.A.) 16, 259 - 266, 1966
- 91 - ROBOZ E. HESS W.C., FORSTER F.M. - Quantitative détermination of
gamma globulin in cerebrospinal fluid
Neurology 3, 410 - 416, 1953
- 92 - ROSENTHAL F.D. and SOOTHILL J.F. - On immunochemical study of
the proteins in cerebrospinal fluid
J. Neuro. Neurosurg. Psychiat. 25, 177-181, 1962
- 93 - ROSSI et SCHNEIDER - Elektrophoretische untersuchung von patholo-
gischen liquor cerebrospinalis
Klin Wschr, 32, 969, 1953

- 94 - ROUPERT (Georges -Emile) - L'électrophorèse des protéines du LCR
PARIS imp. R. Fourlou 21x15,5 (10) -100 m. Tableau Graphiq.
1956.
Thèse Med. Strasbourg N° 2 , 1956
- 95 - SCHEIDEGGER J.J. - Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse
Int. Arch. Allergy 7, 103-110, 1955
- 96 - SCHONENBERG H. - Der liquor cerebrospinalis in Kindersolter.
Gerg. Thieme Verlag, Stuttgart., 1960
- 97 - SCHULTZE H.E., HEIDE K, HAUPT H. - Alpha I antitrypsin ans human
serum
Klin. Wschr 40, 427 , 1962
- 98 - SCHULTZE H.E. et HEREMANS J.F. - Molecular biology of human
protein.
Elsevier publ. Co. ed. Amsterdam. Vol. I 904 p. Section IV,
Chap. 3 : The protein of cerebrospinal fluid p. 732, 1966
- 99 - SMITHIES O. - Zone electrophoresis in starch gel : group varia-
tion in the serum proteins of normal human adult
Biochim. J. 61, 629 - 8 , 1955
- 100 - TCHICALOFF R. et coll. - Contribution of electrophoresis to the
neurological diagnosis
Rev. Med. Suisse Rom. 86, 705-13 oct. 1966
- 101 - WERNER M. - A combined procedure for protein estimation and
electrophoresis of cerebrospinal fluid;
J. Lab. Clin. Med. 74, 166-73 , Jui. 1969
- 102 - WIEDEMAN E. - L'électrophorèse. Son role dans la recherche
biologique et médicale
Rev. Hémat. 3, 251 -255 , 1948
- 103 - WIEME R.J. -Studies on agar gel electrophoresis
Arscia, Bruxelles , 1959
- 104 + WINDISCH R.Pl. and BRACKEN M.M. - Cérebrospinal fluid protein :
concentration by membran ultra-filtration and fractionation
by electrophoresis on cellulose acetate.
Clin. Chem. 16, 416 - 9 , 1970
- 105 - WORK T.S. and WORK E. - "Laboratory technique in biochemistry and
molecular biology"
vol. I Part. I, 1-92 , 1969



TABLE DES MATIERES
=====

	Pages
INTRODUCTION	1
PLAN	3
ABREVIATIONS	8
CHAPITRE I. <u>TRAVAUX ANTERIEURS</u>	9
<u>METHODE D'ETUDE DES PROTEINES DU L.C.R.....</u>	
1, Méthodes de Flocculation	9
2. Méthodes électrophorétiques	11
3. Méthodes immuno-électrophorétiques	24
4. Méthodes complémentaires.....	27
CHAPITRE II. <u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	
<u>METHODES DE SEPARATION et D'IDENTIFICATION</u>	29
1. Electrophorèses sur gel de polyacrylamide	29
2. Identification des fractions sériques	40
3. Essai d'identification de certaines fractions tissulaires.....	44
CHAPITRE III. <u>ESSAI DE CLASSIFICATION DES PROFILS</u> <u>PROTEIQUES DU L.C.R.</u>	51
1. Introduction	51
2. Classification.....	51
3. Discussion	57
CONCLUSIONS	59
BIBLIOGRAPHIE	62
TABLE DES MATIERES	71







